

**BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSÁNAK
VIZSGÁLATA AZ ÁRPÁBAN PROTEOMIKAI
MÓDSZEREKKEL**

Süle Andrea

**Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet
Budapesti Corvinus Egyetem**

Budapest

2008

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fodor Péter
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem

Témavezető: Dr. Hajós Gyöngyi[†]
Osztályvezető, DSc
Táplálkozástudományi Osztály
Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

Dr. Hoschke Ágoston
Egyetemi tanár, CSc
Sör- és Szeszipari Tanszék
Élelmiszertudományi Kar
Budapesti Corvinus Egyetem

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2008. október 7-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Farkas József, MHAS

Tagjai

Lásztity Radomir, DSc

Bóna Lajos, CSs

Nyeste László, DSc

Hegedűs Attila, PhD

Opponensek

Halász Anna, DSc

Gelencsér Éva, CSc

Titkár

Hegedűs Attila, PhD

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	6
1. BEVEZETÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1 Az árpa	11
2.1.1 Az árpa összetétele	12
2.1.2 Fehérje az árpában	13
2.1.2.1 Az árpa fehérjéinek söripari értékmérői	13
2.1.2.2 A fehérjék lokalizációja és változása a mag érése folyamán	15
2.1.2.3 Az árpafajták elektroforetikus fehérjemintázatuk alapján történő megkülönböztetése	17
2.1.3 Proteomikai eredmények az árpa különböző környezeti stresszhatások elleni védekezésében	18
2.2 Proteomika	23
2.2.1 A proteomika jelentősége	23
2.2.2 A proteomika növénybiológiában elfoglalt szerepe	25
2.3 A proteomikában használatos vizsgálati módszerek	26
2.3.1 Az elektroforézis alkalmazása a fehérjék elválasztásában	26
2.3.1.1 Kétdimenziós elektroforézis (2-DE)	28
2.3.2 A proteomika egyéb nem gél alapú vizsgálati módszerei	32
2.3.3 Fehérjeazonosítás tömegspektrometriával	34
2.3.3.1 Q-TRAP elektroporlasztásos tandem tömegspektrometria	35
2.3.3.2 Mátrix által segített lézer deszorpciós ionizáció repülésidő tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS)	36
2.3.3.3 Peptidtömeg ujjlenyomat	37
2.3.3.4 Peptid szekvenálás	37
2.3.3.5 Proteomikai adatbázisok	38
3. CÉLKITŰZÉSEK	41
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	43
4.1 A vizsgált minták	43
4.2 Vegyszerek	43
A fehérjék izolálásához és az elektroforézishez használt vegyszerek	43
4.3 A levélcsíra proteomikai vizsgálata	44
4.3.1 A 'Jubilant', 'Mandolina' és 'Bivoy' árpafajták csíráztatása	44
4.3.2 A levélcsíra fehérjéinek extrakciója	44
4.3.3 Fehérjetartalom meghatározása	44
4.3.4 Árpa levélcsírájából kivont fehérjék kétdimenziós gélelektroforézissel történő elválasztása	45
4.3.5 Tömegspektrometriás vizsgálat	46
<i>In situ</i> emésztés	46
Fehérjeazonosítás tömegspektrometria segítségével	46
4.4 Árpa szemtermés proteomikai vizsgálata	48
4.4.1 Az árpa szemtermés szemcseméret alapján történő osztályozása	48
4.4.2 Évjáratok hatásának ellenőrzése a 'Jubilant', 'Bivoy' és 'Mandolina' fajtákban	48
4.4.2.1 Víz-só oldható fehérjék extrakciója	48
4.4.2.2 Fehérjetartalom meghatározása	48
4.4.2.3 Az árpa szemtermésből kivont fehérjék kétdimenziós gélelektroforézissel történő elválasztása	49
4.4.3 Nehezített termesztési körülmények hatásának vizsgálata	49
4.4.3.1 Árpafehérjék extrakciója	49

4.4.3.2	Fehérjetartalom meghatározása	50
4.4.3.3	Az árpa szemtermésből kivont fehérjék kétdimenziós gélelektroforézissel történő elválasztása	50
4.4.3.4	Tömegspektrometriás vizsgálat	50
4.5	Kadmium hatásának vizsgálata	50
4.5.1	'Jubilant' árpafajta csíráztatása és kadmiummal kezelése	50
4.5.2	'Jubilant' árpafajta levélcsírájából a fehérjék extrakciója	51
4.5.3	Fehérjetartalom meghatározása	51
4.5.4	A levélcsíra karbamid-oldható fehérjeinek SDS-poliakrilamid gélen történő elválasztása	51
4.5.5	Az árpa levélcsírájából kivont fehérjék kétdimenziós gélelektroforézissel történő elválasztása	52
4.5.6	Tömegspektrometriás vizsgálat	52
	<i>In situ</i> emésztés	52
	Fehérjeazonosítás tömegspektrométerrel	53
5.	EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	55
5.1	Hőstressz hatásának vizsgálata két különböző genotípusú árpa levélcsírájának proteomjára	55
5.1.1	Tömegspektrometriás analízis	59
5.1.2	Tömegspektrometriával azonosított fehérjék	62
5.1.3	Hőstressz hatására expressziós változást mutató fehérjék	65
5.2	A különböző talaj-előkészítésből adódó nehezített termesztési körülmények hatásának nyomon követése a 'Jubilant' árpafajtában	74
5.2.1	Tömegspektrometriával azonosított fehérjék jellemzése	80
5.3	A kadmium hatásának vizsgálata az árpa levélcsírájának fehérjeexpressziójára	82
5.3.1	Tömegspektrometriával azonosított fehérjék jellemzése	86
5.4	Évjáratok hatásának ellenőrzése a víz-só oldható proteom szintjén	87
6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	93
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	95
8.	IRODALOMJEGYZÉK	99
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	118

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABA abszcizinsav

APS ammónium-persulfát

APX aszkorbát-peroxidáz

BSA marha szérum albumin

C az akrilamid-biszakrilamid monomerben a biszakrilamid relatív mennyisége százalékban kifejezve

cDNS mRNS-ről az információk reverz transzkripcióval DNS-sé íródnak

CE/MS kapilláris elektroforézis – tömegspektrometria

CID ütközés indukált bomlások

CHAPS 3- [3-kolamidopropil)-dimetilammónium]-1-propánszulfonát

Cor 14b alacsony hőmérséklet által szabályozott fehérje

2-DE kétdimenziós gélelektroforézis

DHB 2,5- dihidroxi-benzoesav

DIGE differenciál 2-D gélelektroforézis

2-D-LC kétdimenziós folyadékkromatográfiában

DNS dezoxiribonukleinsav

DTE ditioeritritol

DTT ditiotritol

eIF-5A transzláció iniciáló faktor 5A

ES elektroporlasztás

ESI-MS elektroporlasztásos (elektrospray) tömegspektrometria

EST részleges expressziós szekvencia információ (Expressed Sequence Tag)

G250 Coomassie Brilliant Blue G 250 festék

GAPDH gliceraldehyd-3-foszfát biszfoszfát dehidrogenáz

GC/MS gázkromatográfia – tömegspektrometria

GBSP keményítőszemcséhez kötődő fehérje (granule-bound starch protein)

GBSSI keményítőszemcséhez kötődő keményítő szintetáz I

HMW HSPs nagy molekulatömegű hősokkfehérjék

HPLC nagyfelbontású folyadék kromatográfia

HSP hősokkfehérje

ICAT izotóppal jelölt affinitáscímke

IEF izoelektromos fókuszálás

IMW HSPs közepes molekulatömegű hősokkfehérjék

IPG immobilizált pH-gradiens

IPG-DALT 2-dimenziós elektroforézis immobilizált pH-gradienssel

K_M Michaelis-állandó

LC-MS folyadékkromatográfia – tömegspektrometria

LC-MS/MS folyadékkromatográfia – tandem tömegspektrometria

MALDI-TOF-MS mátrix által segített lézer deszorpciós ionizáció repülésidő tömegspektrometria

mRNS hírvivő ribonukleinsav

MS tömegspektrometria

MS/MS tandem tömegspektrometria

MudPIT multidimenzionális fehérje azonosítási technika (Multi dimensional Protein Identification Technology)

m/z tömeg/töltés

NCBI National Center for Biotechnology Information

nESI-MS/MS nano elektrospray ionizációs tandem tömegspektrométer

NMR mágneses magrezonancia

OEE2 oxigén kibocsátást növelő fehérje 2 (Oxygen-evolving enhancer protein 2)

PAGE poliakrilamid gélelektroforézis

pI izoelektromos pont

PMF peptidtömeg ujjlenyomat

PPDK piruvát ortofoszfát dikinázt

PR-fehérjék patogenezissel összefüggésbe hozható fehérjék

PSII fotokémiai rendszer II

Q-TRAP LC MS/MS kvadrupol elektroporlasztásos tandem tömegspektrometra

RNS ribonukleinsav

ROS reaktív oxigén gyökök

RuBisCO ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz/oxigenáz

RuBisCO LSU Ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz/oxigenáz nagy alegysége

SAM-S S-adenozilmetionin szintetáz

SBEIIb keményítő elágazó szerkezetének kialakításáért felelős enzim (starch branching enzyme)

SDS nátrium-dodecil-szulfát

SDS-PAGE nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis

sHSPs kis molekulatömegű hősokkfehérjék

SILAC stabil izotópot tartalmazó aminosav

SOD szuperoxid-dizmutáz

T poliakrilamid gélben az akrilamid-biszakrilamid monomer százalékban kifejezett teljes mennyisége g/100 ml-re vonatkoztatva

TCA triklór-ecetsav

TEMED N, N,N',N'- tetrametil- etilén-diamin

TIC teljes ionáramkromatogram

TRISZ trisz- (hidroximetil)-amino- metán

UV ibolyántúli fény

1. BEVEZETÉS

A 21. században a gabonanövények két milliárd tonna éves terméshozamukkal a legfontosabb terményeink közé tartoznak, melyek közül az árpa a negyedik legnagyobb mennyiségben termesztett növény világszerte. Az árpa 10000 évvel ezelőtt terjedt el a Közel-Keleten, és azóta is állatok takarmányozására, sör, illetve kisebb mennyiségben ételek készítésére használják.

Az árpa is - mint bármely más termesztett növény - élete során folyamatosan ki van téve olyan biotikus és abiotikus hatásoknak, amelyek jelentősen befolyásolják fejlődését, növekedését, és meghatározzák produktivitását. Abban az esetben, ha a környezeti feltételek az adott faj igényeinek megfelelő optimumértékeken kívül esnek (túl alacsony, illetve túl magas hőmérséklet, kiegyenlítetlen ásványi anyag ellátás, nem megfelelő fényviszonyok, vízhiány stb.), a növény élettani stresszhelyzetbe kerül. Hazánkban a különböző környezeti, abiotikus hatások (főként szárazság) következtében a gabonafajtáink a bennük rejlő termőképességnek átlagosan csak a felét tudják produkálni, ami jelentős gazdasági veszteséget jelent. Természetesen ezért olyan abiotikus és biotikus stresszhatásokkal szemben ellenálló fajták nemesítése a cél, amelyekkel a gazdasági károk is csökkenthetők.

A fenti előzményekből kiindulva doktori munkám során célul tűztem ki, hogy proteomikai módszerekkel (2-DE, MS) megvizsgáljam a hazai körülmények között termesztett és a környezeti stresszhatásokra érzékeny 'Jubilant', illetve ezen hatásokra kevésbé fogékony 'Mandolina' sörárpák fehérjéinek expressziós változását, amelyet a magas hőmérséklet, a kadmiumszennyezettség és az eltérő termesztési körülmények okoznak. A stresszhatások fehérjék szintjén történő vizsgálata azért is kiemelt fontosságú, mert a transzkriptomban kimutatott stresszválaszok körülbelül 20%-ához tartozó expressziós szekvenciárészletek (EST) funkciója még ismeretlen, így a proteomban megvalósuló jeltovábbítás, szabályozás, enzimatis aktivitás és szerkezeti funkciók megismerése közvetlenül a proteom szintjén válik lehetővé.

A különböző stresszhatásokkal szembeni védekezésben a stressz hatására indukált molekulák közül a stresszfehérjéknek nagyon nagy szerepük van, hiszen hozzájárulnak az egyes stresszhatásokkal szembeni ellenálló képesség fokozásához. Így a stresszválaszokban részt vevő fehérjék azonosítása elengedhetetlen a táplálékláncunkba való bekerülésük kockázata miatt. Ezt látszik alátámasztani az a tény, hogy az elmúlt években proteomikai módszerekkel nagy számban izoláltak és karakterizáltak élelmiszereinkből növényi eredetű allergéneket, melyek között a növényi védekezésben részt vevő fehérjék is jelen voltak.

A védekezésében részt vevő fehérjék felkutatása mellett részletesebb képet kívántam felvázolni arról is, hogy a különböző abiotikus stresszhatások miként befolyásolják élelmiszeripari nyersanyagaink fehérje-összetételét.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az árpa

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) a *Liliales* rend, *Liliaceae* családjának *Hordeum* nemzetségéhez tartozik. Az árpa diploid növényfaj $2n=14$ kromoszómaszámmal. Genommérete 4,9 pg DNS/haploid sejtmag, ami $4,9 \times 10^9$ bp-nak felel meg. Az árpagenom - a többi gabonaféléhez hasonlóan és a növényvilágra jellemzően - egyedi és ismétlődő szekvenciákból áll (FLAVELL, 1980).

Az árpát nagy alakgazdagsága következtében a legkülönbözőbb éghajlatú országokban termesztik: a rövid nyarú északi országokban ez a legfontosabb gabona; a meleg déli országokban szemtermését abraktakarmányként hasznosítják; az enyhe, mérsékelt meleg nyarú vidékeken pedig sörárpát termesztnek. Elterjedési területe nagyon széles, Norvégiában a 70. szélességi fok alatt minden évben termést ad, de az Alpok 1900 m-es, a Kaukázus 2700 m-es, a Himálája és Tibet 4600 m-es magasságában is termesztik. Nagy alkalmazkodóképességének, de elsősorban rövid tenésziidejének köszönhetően a szubtrópusi viszonyok között is termesztethető.

Kialakulásában a többsoros (*Hordeum agriocrithon* Aberg) és a kétsoros árpa (*Hordeum spontaneum* Koch) játszik meghatározó szerepet. Származási helye Kelet-Ázsiába tehető.

Az árpa az egyik legrégebben kultúrába vont növényünk, termesztése a világ több termőhelyén megelőzte a búzát is, és mintegy 7000 évvel ezelőtt már sört is készítettek belőle (LŐRINCZ, 1984).

A múltban sokkal nagyobb arányban használták emberi fogyasztásra, mint napjainkban. A ma ismert közvetlen emberi fogyasztási (felhasználási) területe nálunk: a kása (árpagyöngy), árpapehely, árpakáv és a sör, míg az USA-ban ennél sokkal több formában hasznosítják az élelmezésben: pattogatott árpa, árpapehely, árpacsíra, árpakeményítő, édesítőszer, árpa-maláta, lisztkiegészítő, malátázott tej, csecsemőtáp szirupok, árpatea vagy kávéhelyettesítő és rizslágyító készül belőle. Az árpa β -glükán tartalma a táplálkozás szempontjából megkülönböztetett figyelmet érdemel, ugyanis csökkenti a vér koleszterinszintjét. Az árpa a benne található oldható élelmi rostok viszonylag magas aránya miatt jelentős hatással lehet az egészségre (MATUZ, 2000).

Az árpa 70-80 millió hektárnyi vetésterületével negyedik a termesztett növények között. Magyarországon általában az őszi vetésű, többsoros árpákat és a tavaszi vetésű, kétsoros árpákat

termesztik. Hazai vetésterülete ingadozó: 200 ezer ha az őszi és 132 ezer ha a tavaszi árpa területe (KSH, 2008).

2.1.1 Az árpa összetétele

Az árpaszem tápanyag-összetétele nagy nyersrost- és vitamintartalma, magasabb lizintartalma miatt az egygyomrú állatok (sertés, baromfi) számára előnyös (MATUZ, 2000). A gazdasági állatok takarmányozására elsősorban az őszi árpát használjuk, a tavaszi árpából csak azok a tételek szolgálnak erre a célra, amelyeket az élelmiszeripar (sörgyártás, malomipar) valamilyen okból nem dolgoz fel.

A tavaszi árpa kémiai összetételét az 1. táblázat mutatja be. A táblázat adatai átlagadatok, amelyek fajtánként változnak, és amelyekre jelentős hatást gyakorolnak a termesztés körülményei (agrotechnika, talajerő-gazdálkodás, csapadékviszonyok) is (HEGYESNÉ, 2004).

1. táblázat: A tavaszi árpa kémiai összetétele.

Forrás	Száranyag/ gabona (g kg ⁻¹)	Nyersfehérje	Nyerszsír	Nyersrost	Nyershamu	N- mentes kivonat
Tavaszi árpa						
FUTTERWERTTABELLEN (1991)	880	117	22	52	28	781
BECKER-NEHRING (1965)	860	114	22	44	28	792
INRA (1988)	860	116	23	51	27	783
JEROCH et al. (1993)	880	120	23	53	28	776
ADAS (1990)	869	128	15	45	27	785
FUTTERMITTELTA-BELLENWERK (1972)	880	114	23	50	28	785
Átlag	871	118	21	49	28	784

A tavaszi árpa söripari felhasználását - meghatározó minőségi paraméterként - jelentős mértékben befolyásolja a malátázhatóságra nagymértékben kiható nyersfehérje-tartalom, de ezen kívül fontos a többi minőségi előírás (osztályozottság, hektolitertömeg, stb.) betartása is. Hazánkban ezeknek a követelményeknek az elsők között a 'Jubilant' sörárpafajta felel meg.

2.1.2 Fehérje az árpában

Az árpa fehérjetartalma 8-14% (LÁSZTITY, 1999b), mely mindig függ az adott fajtától, termesztési helytől és a N-ellátottságtól (OSCARSSON et al., 1996). Az árpa fehérjetartalmának megállapítása nagy fontossággal bír az árpa minőségének meghatározásában, az egyes árpafajták azonosításában (GÖRG et al., 1992a), valamint fontos karakterisztikus tulajdonságokra, mint például a maláta minőségi paramétereire is lehet belőle következtetni (GÖRG et al., 1992b). N-műtrágyázással az árpa nyersfehérje-tartalma növelhető, mely elsősorban az árpafehérje hordein frakcióját növeli meg. A söripár szempontjából a nitrogén-műtrágyázás a minőségre és a hozamra kedvezőtlen hatást gyakorolhat, mivel rontja a sörárpa fizikai és beltartalmi értékeit.

Az árpa fehérjeit OSBORNE-féle (1907) oldhatóság alapján csoportosíthatjuk vízzoldható albumin (3-12,1%), sóoldható globulin (8,4-20%), alkohololdható hordein (25-50%) és sav- illetve lúgoldható glutelin frakciókra (hordenin) (30-54,5%). Az egyes frakciók különböző fehérjék keverékéből épülnek fel (LÁSZTITY, 1999a.), melyek jellemzésével indultak el az árpafehérjékkel kapcsolatos vizsgálatok a 70-es években. A legfőképpen enzimeket és enzim inhibitorokat tartalmazó, és az embrióban, valamint az aleuron rétegben koncentrálódó vízzoldható albumin és sóoldható globulin fehérje frakciókról már PAYNE és RHODES (1982), valamint WEISS és munkatársai (1992a) is írtak. SHEWRY és MIFLIN (1985) az árpa alkohololdható hordein frakcióját osztották fel négy csoportra molekulatömegük és aminosav tartalmuk alapján, melyeket a továbbiakban WEISS és munkatársai (1992b) és LÁSZTITY (1999b) tanulmányoztak mélyrehatóbban.

2.1.2.1 Az árpa fehérjéinek söripari értékmérői

Az árpa söripari minőségének alapvető követelményeit a Magyar Szabvány-081326 (1979) rögzíti. Ennek megfelelően a sörgyártásnál a malátakészítés megkívánja az árpa nagy szemeteltségét, 65-68 kg-os hl tömeget, kiegyenlített szemnagyságot, valamint az erőteljes és egyenletes csírázóképeséget. A minőség legfőbb értékmérője a fehérjetartalom, a keményítőtartalom, a kivonható (extrakt) anyag mennyisége és az oldhatósági fok. A 11-11,5 % nyersfehérjét tartalmazó árpából jobb minőségű sör készíthető, mint a fehérjében nagyon szegény (9-10%), lassan csírázó nagy szemű árpából. A felsorolt minőségi tényezők mellett főleg a nyersfehérje-tartalom szabja meg a sör minőségét, ízét, kémiai stabilitását. A sörárpa fehérjetartalmának felső határaként a 12,5%-ot tekintjük.

A fehérjék a maláta és a sör minőségére is komplex hatással vannak. Az árpa szemtermésen belül a fehérjék az endospermiumban fehérjemátrixot alkotnak, melybe keményítőszemcsék ágyazódnak be. BOREN és munkatársai (2004) adtak némi betekintést két árpafajta ('Barke' és

'Midas') szemtermésében a keményítőszemcséhez kötődő fehérjékről (GBSPs), melyek az endospermiumban a keményítőszemcsék felületéhez kötődnek, vagy pedig azon belül helyezkednek el. Ezen fehérjék extrakcióját követően az ezüsfestéssel megfestett kétdimenziós géleken 150 fehérjefolt vált láthatóvá, melyek közül 74-et tudtak azonosítani peptidtömeg ujjenyomat (PMF) és tandem tömegspektrometriás (MS/MS) szekvenálás segítségével. Az azonosított fehérjék legnagyobb része a keményítőszintézis négy fő enzime közül került ki, mint például 49 db fehérje a keményítőszemcséhez kötődő keményítő szintetáz I (GBSSI) volt, de ezen kívül a keményítő szintetáz I (SSI), a keményítő szintetáz II (SSII) és a keményítő elágazó szerkezetének kialakításáért felelős enzimek ('starch branching' enzim, SBEIIb) is jelen voltak a fehérjék között. Ezen felül B és D hordeineket, szerpin Z4-et, piruvát ortofoszfát dikinázt (PPDK), és egy tiamin bioszintézisben szerepet játszó enzimet is sikerült azonosítani. A kísérlet alapján azt a következtetést vonták le, hogy a keményítő-bioszintézisben részt vevő enzimek a keményítőszemcsén belül, míg a többi azonosított fehérje a keményítőszemcsékhez kötődve helyezkedik el.

Az árpa csírázása alatt az embrióból gibberelinsav szabadul fel, amely hidrolitikus enzimek szintézisét indítja be az aleuron rétegben. A hidrolitikus enzimek hatására a malátázás folyamán a fehérjemátrix felbomlik, így a keményítő hozzáférhető válik (MACGREGOR, 1999). Fizikokémiai szerkezeti változások következtében a sejtfal degradálódik, és a hordein fehérjék oldható peptidekké és aminosavakká alakulnak (PALMER, 1991). WEISS és munkatársai (1992a) eltérő malátaminőséget adó árpafajták fehérjefrakcióinak változását kísérték végig hét napos csírázás alatt egydimenziós nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS PAGE) használatával. A csírázás során az albumin és globulin frakciót adó fehérjesávokban csak kisebb mennyiségi változások mentek végbe: egy 65 kDa nagyságú fehérje intenzitása csökkent, és két új fehérje, egy 43 kDa és egy 60 kDa nagyságú fehérje (feltételezhetően α -és β -amiláz) jelent meg a csírázás negyedik napján, melyek koncentrációja attól kezdve folyamatosan nőtt. A hét napos csírázás végére a hordein frakció teljesen eltűnt, lebomlott.

A malátázás során az enzimek közül az endo- β -glükánáz, exo- β -glükánáz, cellobiáz, laminaribiáz, exoxilanáz, arabinozidáz, α -és β -amiláz izoenzimek, endopeptidázok, karboxipeptidázok, aminopeptidázok, peptid hidrolázok a legjelentősebbek (LÁSZTITY, 1999b). Az amilázok és azon belül is főképpen az α -amiláz az árpa tárolása és a malátázás alatti fontos szerepe miatt a legtöbb árpával kapcsolatos kutatás tárgyát képezi (SVENSSON, 1994; BAK-JENSEN et al., 2007).

A fehérjemátrix túlzott, illetve elégtelen mértékű lebontása problémákhoz vezethet a sör minőségében. Túlzott lebontás esetén a maláta extrakt színe kedvezőtlenül változik és a sör habstabilitása is csökken. Az elégtelen fehérjebontás pedig gátolja malátázáskor az enzimek

hozzáférését a keményítőmolekulákhoz, így cefrézéskor a keményítőkonverzió nem lesz megfelelő. A sör tárolása ilyen esetben tárolási problémát okoz, másrészt a kis mennyiségű aminosav miatt az élesztő-anyagcsere sem megfelelő az erjesztés alatt. A sörfőzéskor fellépő szűrési problémákért is a fehérjék tehetők felelőssé. Mindezek alapján a jó minőségű sör előállítása érdekében fontos, hogy malátázás alatt a fehérjetartalom és annak hidrolízise optimális mértékű legyen (MACGREGOR, 1999).

2.1.2.2 A fehérjék lokalizációja és változása a mag érése folyamán

A fehérje az árpa szemtermésében három elkülönült helyen halmozódik fel: az aleuron rétegben mint sikefehérje, az endospermium külső peremén mint tartalékfehérje és az endospermiumban mint hisztológiai vagy szövetfehérje (LÁSZTITY, 1999a), valamint a csírában.

FINNIE munkatársaival (2003) megvizsgálta az árpacsírából, endospermiumból és aleuron rétegből külön-külön kivont víz-só oldható fehérjéket kétdimenziós elektroforézissel (2-DE), és összevetette az árpa teljes szemterméséből ugyanazon módon kivont és elválasztott kétdimenziós fehérjetérképével. A kísérletből megállapították, hogy a teljes árpa szemtermés víz-só oldható fehérjeinek kétdimenziós elektroforetikus (2-DE) elválasztásából adódó fehérjetérképén a megjelenő fehérjefoltok körülbelül 50%-a az endospermium fehérjeit reprezentálja. Az endospermium nem víz-só oldható fehérjei az árpa tartalék fehérjei közé tartoznak, a gélen látható többi fehérje (~50%) pedig az aleuron rétegből és a csírából származtatható. A kiértékelésből kitűnik, hogy a fehérjék nagy része több szövetben is jelen volt, igaz különböző mennyiségekben. Az endospermiumban az alacsony molekulatömegű fehérjék között legtöbbször az α -amiláz/tripszin inhibitorok, valamint a kimotripszin inhibitorok fordultak elő. Ezen fehérjék kis mennyiségben az aleuron rétegben is megfigyelhetőek voltak, de ez valószínűleg az endospermium kontaminációjából adódott. Az α -amiláz/tripszin és kimotripszin inhibitorok endospermiumon belüli lokalizációja egybevág GUTIERREZ és munkatársai (1990) azon elképzelésével, hogy ezen inhibitorok a keményítő rovarkártevők elleni védelmét szolgálják úgy, hogy egyes típusaik specifikusan csak a rovar eredetű α -amiláz enzimeket ismerik fel. Ide tartozik a CM-fehérjék családjába, valamint a Kunitz-típusú fehérjék családjába tartozó α -amiláz inhibitorok egy része (SVENSSON et al., 2004). Az embrióban és az aleuron rétegben kifejeződő alacsony hőmérséklet által szabályozott fehérje (Cor 14b), a kis moltömegű hőshockfehérjék (sHSPs) I. osztályába tartozó fehérjehomológ és egy tioredoxin-peroxidáz a kiszáradás elleni védelemben, valamint egyéb stresszhatásokban nyújtanak segítséget. Az

aleuron réteg és az embrió stresszhatások elleni védelemben betöltött együttes szerepét már OLSEN (2001) is leírta.

Az árpa szemtermés és maláta bázikus fehérjéinek vizsgálatára BAK-JENSEN és munkatársai dolgoztak ki (2004) egy kétdimenziós elválasztáshoz alkalmazható protokollt. A kísérleteikben pH 6-11 intervallumban - a Dániában legnépszerűbb - 'Barke' sörárpa szemterméséből 380, az ebből készült malátából pedig összesen 500 fehérjét választottak el kétdimenziós géleken a 6,5-10,2 izoelektromos pont és 11,2-61,7 kDa molekulatömeg tartományokban. A fehérjék azonosítását mátrix által segített lézer deszorpciós ionizáció repülésidő tömegspektrométerrel (MALDI-TOF-MS), nano elektropray ionizációs tandem tömegspektrométerrel (nESI-MS/MS) és N-terminális szekvenálással végezték és ilyen módon 37 különböző fehérjét tudtak azonosítani. A fehérjéket a sejtben betöltött funkcióik alapján hat különböző kategóriába sorolták: 21 fehérjét a rovarkártevők elleni védekezésben szerepet játszó fehérjeként, míg 11 fehérjét a szénhidrát metabolizmus enzimeiként (pl. α -galaktozidáz) azonosítottak; kilenc a stressz és méregtelenítési folyamatokban vesz részt, továbbá két peroxiredoxin a reaktív oxigén gyököket (ROS) távolítja el. Glikolitikus enzimek közül hat fehérjefolt a gliceraldehid-3-foszfát biszfoszfát dehidrogenázt (GAPDH), ezen kívül két fehérjefolt a fruktóz-biszfoszfát aldolázt, egy pedig a piruvát kinázt reprezentálta.

FINNIE és munkatársai (2002) kétdimenziós elektroforézis alkalmazásával írták le, hogy négy árpafajta ('Barke', 'Meltan', 'Mentor', és 'Morex') szemtermésének érése alatt milyen fehérjeexpressziós változások mennek végbe. Öt héten át heti egyszeri mintavételezéssel a víz-só oldható fehérjéket vizsgálták. Megállapították, hogy a szemtermés érési folyamatát a citoplazmatikus almasav-dehidrogenáz és a trióz-foszfát izomeráz változatlan mértékű expressziója kíséri végig, de egyes fehérjék csak a fejlődés bizonyos stádiumaiban vannak jelen: például az aszkorbát-peroxidáz a korai magduzzadás során, míg az alacsony hőmérséklet által szabályozott fehérje (Cor14b) a szemtermés kiszáradásakor. A szemtermés fejlődése folyamán megfigyelték a kis molekulatömegű α -amiláz/tripszin inhibitorok, szerin proteáz inhibitorok és az oxidatív stressz elleni védekezésben részt vevő enzimek folyamatos akkumulációját. A kísérletek további folytatásában a 'Barke' fajta érésének nyomon követésekor - a különböző fejlődési stádiumokban - az egyes fehérjék eltérő izoformokban történő megjelenését tapasztalták (FINNIE et al., 2006).

FINNIE (2003) a fejlődő árpa szemtermés endospermiumából víz-só oldható fehérjéket nyert ki, melyekről megállapította, hogy a központi metabolizmusban, nitrogen asszimilációban, aktív oxigén gyökök semlegesítésében és szabályozó folyamatokban vesznek részt. Az azonosított fehérjék kisebb mennyiségben az érett árpa szemtermés endospermiumában is jelen voltak. Amikor a kiszáradás során az árpa szemtermés víztartalma 10-15% közé csökken, az

endospermium sejtei ezt nem élik túl, programozott sejthalálon, apoptózison mennek át. míg az aleuron réteg és az embrió egy alap metabolikus aktivitást tart fenn (LEPRINCE et al., 1993).

2.1.2.3 Az árpafajták elektroforetikus fehérjemintázatuk alapján történő megkülönböztetése

A 90-es években az egydimenziós elektroforézis alkalmazásával kiderült, hogy ezzel a módszerrel nem lehetséges az árpafajták megkülönböztetése, mivel az egydimenziós elektroforézis igencsak limitált felbontással bír, sőt sok esetben komplikált fehérjemintázatot is ad, melyben az egyes fehérjekomponensek eltakarják egymást. Így a megoldást a 2-DE jelentheti. Első ízben GÖRG és munkatársai (1988) próbálták 14 árpafajtát megkülönböztetni, melyhez az árpa leveléből redukáló közegben izoláltak fehérjéket, és elválasztották azokat a 2-DE immobilizált pH-gradienst tartalmazó (IPG DALT) változatával. A kísérletben ezüsfestést alkalmazva nyolc napos levelek fehérje extraktját vizsgálták pH 4-7 és pH 6-10 pH-gradienssel. A kiértékelés során számos kvalitatív különbséget találtak, melyek vagy egyes fehérje foltok elmozdulásából, vagy pedig a fajták közötti eltérő fehérjeexpresszióból adódtak, és lehetővé tették az egyes fajták egymástól való megkülönböztetését. A későbbiekben 14 árpafajta szemterméséből karbamid/ditiotreitol (DTT)/Nonidet P40 oldószerben oldódó fehérjék kétdimenziós fehérjemintázata alapján is egyértelműen különbséget tudtak tenni a fajták között. Az egyes fajták eltérő malátázhatóságaért felelős markerfehérjéket azonban nem sikerült azonosítaniuk a gélek kvalitatív kiértékelése során (GÖRG et al, 1992a).

ØSTERGAARD és munkatársai (2002) - Görg 1992-es munkájából kiindulva erőfeszítéseket tettek arra, hogy felkutassák az árpában a jó malátázhatóságért felelős markerfehérjéket. Négy különböző malátázhatóságú árpafajta ('Barke', 'Harrington', 'Morex', 'Regatta') szemtermését és malátáját vizsgálták 2-DE alkalmazásával pI 4-7 izoelektromos pont tartományban és referenciaként a legjobb söripari tulajdonságot mutató dán 'Barke' fajtát használták. A kísérleteik során azt tapasztalták, hogy az árpa szemtermésben az α -amiláz/tripszin inhibitorok, a malátában pedig az egyik α -amiláz izoenzim mutatott expressziós különbséget a fajták között. Az egyes eltérő malátázhatóságú fajták összehasonlítására irányuló kísérleteket a továbbiakban FINNIE és munkatársai (2004) folytatták a 'Barke' árpafajta 'Golden Promise'-sal történő összevetésével, melynek során az eltérést adó fehérjék között kitinázt és kis moltömegű hőszokkfehérjékkel homológiát mutató fehérjéket azonosítottak. A kísérletet kibővítették az üvegházban és szántóföldön nevelt árpanövények proteomjának összehasonlításával is. Ezen felül FINNIE és munkatársai (2006) a 'Barke' és a 'Morex' árpa szemtermés érése alatti fehérjeexpressziós változásokat is összevetették, és különbségeket találtak egyes fehérjék

ideiglenes expressziója között. Az érés kezdeti szakaszában csak a 'Morex' fajtában volt detektálható a β -1,3 glükánáz G-I izoenzime, mely a 'Morex' fajta érését – egyes vizsgálatok alapján – meggyorsítja. Az enzim egyébként a fejlődés további szakaszaiban is kimutatható mindkét fajtából, de aratás idején már alig detektálható. Hasonlóan eltérő volt az expressziós megjelenése egy peroxidáz izoenzimnek is, amely a 'Morex'-ben az érés korábbi stádiumában volt megfigyelhető, mint a 'Barke' esetében. Ez alapján az a következtetés vonható le, hogy az érés alatti fehérjeszintézisbeli változások az egyes árpafajták karakterisztikus jellemzői (FINNIE, 2006).

2.1.3 Proteomikai eredmények az árpa különböző környezeti stresszhatások elleni védekezésében

A különböző stresszhatások proteom szintjén történő tanulmányozása egy új tudományterület: a környezeti proteomika (environmental proteomics) (QURESHI et al, 2007). Gazdasági növényeink közül főként a rizsszel (SARUYAMA és TANIDA, 1995; SALEKDEH et al., 2002) kukoricával (RISTIC et al., 1991; MAGNARD et al., 1995) és búzával (ZHANG és RIECHERS, 2004) foglalkozik.

A kísérletek többnyire arra keresik a választ, hogy a különböző stresszhatásokra hol és milyen típusú fehérjék expresszálódnak eltérő mennyiségben, és ezek milyen hatással vannak a sejt metabolizmusára (QURESHI et al, 2007). A stresszhatások fehérjék szintjén történő vizsgálata azért is kiemelt fontosságú, mert a transzkriptom szintjén kimutatott stresszválaszok 20%-ához tartozó expressziós szekvenciárészletek (EST) funkciója még ismeretlen (BOHNERT, 2001). Ezen kívül a növényi védekezésben részt vevő fehérjék (PR-fehérjék, egyes proteázok és proteáz inhibitorok) tanulmányozása és azonosítása nagy jelentőséggel bír élelmiszer- és egészségtudományi szempontból is, mert ezen fehérjék egy részét élelmiszerallergénként tartják számon (BREITENEDER és RADAUER, 2004).

- **A stressz definíciója**

A megterheléssel járó - egy adott szervezetben a normálistól eltérő viselkedéshez vezető - helyzet leírására a növények esetében is a stressz kifejezést használjuk (SZIGETI, 1998). LARCHER (1987) a következőképpen határozta meg: „a stressz egy olyan terheléses állapot, amelyben a növényvel szembeni fokozott igénybevétel a funkciók kezdeti destabilizációját követően egy normalizálódáson át az ellenállóság fokozódásához vezet, majd a tűréshatár túllépésekor tartós károsodást vagy akár pusztulást is okoz”.

A növényekre ható stressztényezőket többféleképpen csoportosíthatjuk, az egyik szokásos felosztás szerint beszélünk természetes (abiotikus) tényezőkről, valamint antropogén faktorokról. Természetesnek tekintjük a természeti környezet spontán, de hirtelen vagy szélsőséges megváltozásait: a nagy fényintenzitást, a hőhatást, a vízhiányt, az ásványi tápanyagok hiányát, az alacsony hőmérsékletet, a hirtelen fagyot, a nagy sókoncentrációt stb. Míg antropogén stressztényezőként tartjuk számon a herbicideket, a légszennyező anyagokat (kén- és nitrogénoxidok, ózon stb.), a savas esőt, a talajsavanyodást, a toxikus nehézfémek feldúsulását, a fokozott ibolyántúli (UV) sugárzást stb. A természetes és antropogén faktorok gyakran azonosak is lehetnek (SZIGETI, 1998).

Másik szempont szerint beszélünk abiotikus (abiogén) és biotikus (biogén) stressztényezőkről. Ez utóbbiak közé tartoznak a növények parazitái: vírusok, baktériumok, gombák, de ide soroljuk az állatok rágása által okozott stresszeket is (SZIGETI, 1998).

- **Hőstressz**

A hőmérsékletnek az egyes életfolyamatok intenzitására gyakorolt hatása jól ismert. Az optimális alkalmazkodás tartományán túli hőmérséklet, azaz a hőség, illetve a nagy hideg jelentősen befolyásolják az anyagcserét, a növekedést, a növény életképességét. A növény számára optimális hőmérséklet meghatározásához egyes enzimeket, mint pl. almasav-dehidrogenáz és a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzimek Michaelis-állandóját (K_M) használják, ami a növény termőhelyének átlagos hőmérsékleti optimumával jó korrelációt mutat. Ennek segítségével meghatároztak egy fajspecifikus, kinetikus hőmérsékleti sávnak (thermal kinetic window) nevezett hőmérsékleti intervallumot, melynek határait az a két hőmérsékleti érték jelöli ki, melyek között a K_M a minimális hőmérsékleten mértnek kétszeresére nő. Az intervallum felső határértéke felett a növény hőstressznek van kitéve (SZIGETI, 1998). A létező három hőrezisztencia-típus közül a szántóföldi növények a hőérzékeny fajok közé tartoznak, melyek már 30-40°C, de maximum 45°C-nál károsodnak. A magas hőmérséklet a membránok állapotát és a proteinek konformációját befolyásolja. A növényekben a hősokk, vagyis az optimális növekedéshez szükséges hőmérséklettől magasabb hőfok génexpressziós változást indít el, mely során hősokkfehérjék (HSPs) keletkeznek (HOWARTH, 1991). A hősokkproteinek vagy hősokkfehérjék már az optimális hőmérséklettől való 10°C-os emelkedés esetén expresszálódnak és molekuláris dajkafehérje funkciót látnak el (NECCHI et al., 1987; SZIGETI, 1998).

A hősokkfehérjéket a szakirodalom molekulatömegük alapján különbözteti meg, mely szerint lehetnek nagy (80-100 kDa, HMW HSPs), közepes (68-73 kDa, IMW HSPs) vagy kis (15-20 kDa, kDa, sHSPs) molekulatömegű HSP-k. Az utóbbi csoport tagjait intracelluláris

lokalizációjuk, dezoxiribonukleinsav (DNS) szekvenciájuk hasonlósága, valamint immunológiai reakciókban mutatott keresztreaktivitásuk miatt hat gécshalád termékei közé sorolják (VIERLING, 1991). A sHSP-k pontos funkciója még nem tisztázott, de feltételezhetően molekuláris dajkafehérje szerepet töltenek be, nem szükségesek a sejt celluláris funkciójának ellátásához (SUN, et al., 2002). A HSP-k termelődése rendkívül gyors és intenzív annak köszönhetően, hogy ez a túléléshez szükséges válaszlépés. Képződésüket már többféle növényi szövetben, például szemtermésben, hajtásban és gyökérben is kimutatták hőstressz hatására. A kísérletekben feltűnt, hogy az alkalmazott hőstressz időtartamától függően változik a hősokkfehérjék expressziós profilja (NECCHI et al., 1987). Ilyen fehérjék termelődését más stresszhatás is beindítja, úgymint az oxigénhiányos állapot, aminosav-analógok, etanol, oxidatív foszforiláció inhibitorai, nehézfémionok és mérgek jelenléte (MORIMOTO et al., 1990). A hősokkfehérjék több funkciót töltenek be a sejt fiziológiájában és túlélésében: részt vesznek a szignál transzdukcióban (PICARD et al., 1990), abnormális fehérjék elszállításában (ANANTHAN et al., 1986), hidrofób fehérjekomplexek szétszedésében (PELHAM, 1986), összekapcsolódnak specifikus fehérjékkel (PINHASHI-KIMHI et al., 1986), valamint van szerepük fehérje és fehérjekomplexek áthelyezésében és összegyűjtésében (CHIRICO et al., 1988; DESHAIES et al., 1988) is.

A gabonanövények közül a hősokkfehérjéket elsőként kukoricában (BASZCYNSKY et al., 1982) vizsgálták, majd hamarosan cirokban (OUGHAM és STODDART, 1986) és árpában (MARMIROLI, 1986) is sikerült kimutatni őket egydimenziós elektroforézissel. NECCHI (1987) az árpa gyökerében és hajtásában vizsgálta egydimenziós SDS gélelektroforézissel különböző időtartamú 40°C-os hőkezelést követően a hősokkfehérjék expressziójának változását. Megfigyelései alapján a hőkezelés időtartamától függően korán és későn (hat óra múlva) szintetizálódó HSP-ket különböztetett meg.

MARMIROLI (1989) megfigyelései szerint a hőmérséklet emelkedésével az árpanövények fehérjeszintézise fokozatosan a hősokkfehérjék (HSP-k) képződése irányába tolódik el. Ezek a hőtűrést javító, fajtától és fejlődési állapottól függő fehérjék különböző molekulatömegűek, képződésük szoros összefüggésben van a termotolerancia kialakulásával (KRISHNAN et al., 1989). A 38°C-nak kitett árpacsíranövények leveleiben két nagy (67-72 kDa-os) és négy kisebb (17-21 kDa-os) molekulájú HSP jelent meg. Kis molekulatömegű HSP-k a membránfrakcióban is előfordulnak, ezért lehetséges a tilakoidmembránok részt vétele a korai HSP-k szintézisében (CLARKE és CRITCHLEY, 1990).

A hőstresszt a modern proteomika eszközeivel - a gabonanövények közül - többek között a búza magjában tanulmányozták. MAJOUL és munkatársai (2003) a post-anthesis különböző stádiumaiból vettek mintát és kimutatták a normál (18°C nappali/10°C éjszakai) és hőkezelést

(34°C nappali/10°C éjszakai) kapott búza ('Thesee') szemterméséből a hőstressz hatását. Kétdimenziós fehérjeelválasztást követően összesen 37 olyan fehérjét találtak, melyek expressziója szignifikánsan változott a hőkezelés hatására. A glükóz-1-foszfát adeniltranszferáznak, a szénhidrát szintézis egyik enzimének expressziója a hő hatására csökkent. Ennek a fehérjének a mennyiségi változása is szerepet játszhat abban, hogy a szemtermés tömege hőhatásra csökken. A hőkezelés következtében számos HSP szintézise fokozódott, többek között a HSP70 és HSP90 család tagjainál volt megfigyelhető - a kontroll mintához képest - expressziós változás. Ezen kívül a növény védekezését segítő CAT izozimnál, valamint a sikiminsav anyagcsereút egy enziménél (DAHP szintetáz), a tárolt zsír mobilizálásában résztvevő enzimnél (dihidroflavonol-4-reduktáz), valamint a szénhidrát szintézis enzimeinél (keményítőszemcséhez kötött glikogén szintáz prekursor és GBSS), illetve a glikogénézis és glükoneogénézis (glükóz-6-foszfát izomeráz) enzimeinél is megfigyeltek mennyiségi növekedést hő hatására. Következő kísérleteikben a hőhatást már a búza szemtermés víz-só oldható fehérjeinek szintjén tanulmányozták (MAJOUL et al., 2004), mindössze egy új fehérje indukcióját figyelték meg, míg számos fehérje expressziójának változását tapasztalták.

- **Szárazságstressz**

VARGA-HASZONITS (1985) szerint a szárazság: rövidebb vagy hosszabb ideig tartó száraz időjárás. Az aszály kifejezés alatt mindig hosszabb ideig tartó és jelentős mértékű szárazságot jelöl. A legtöbb mezőgazdasági szakember szerint szárazság alatt a vízhiányos időjárási helyzet értendő (azaz meteorológiai fogalom), míg az aszály főként agronómiai fogalom. E megközelítés alapján az aszály a szárazság következményeként lép fel (SZÁSZ, 1988). SZIGETI (1998) szerint a szárazságstressz az az állapot, amikor nem áll elegendő, megfelelő termodinamikai állapotban lévő víz a növény rendelkezésére. Gazdasági növényeink nagy többsége a vízhiányra érzékeny növények csoportjába tartozik. A vízhiány következtében az árpanövények szárában nő a lignin és csökken a fehérjetartalom (LEINHOS és BERGMANN, 1995).

A sóstresszhez hasonlóan az árpanövények szárazságban is abszcizinsavat (ABA) koncentrálnak, ami prolinfelhalmozást vált ki (STEWART és VOETBERG, 1985), de betain (HANSON és NELSEN, 1978), valamint poliaminok (TURNER és STEWART, 1986) gyarapodását is megfigyelték. A vízstressz által az árpa csíranövényekben indukált ABA a felelős a 14,2-22,6 kDa-os polipeptideket (dehidrineket) kódoló cDNS-ek (*Rab* gének) felszaporodásáért is (CLOSE et al. 1989).

Az egyszikű növények közül SALEKDEH és munkatársai (2002) már rizsben is tanulmányozták proteomikai módszerekkel a szárazság hatását. Kísérleteikben a

fotoszintézisben, a sejt elongációban, a metabolizmusban és a lignifikációban részt vevő fehérjék szintjén tapasztaltak expressziós változást. Ezek közül két fehérjéről, az aszcorbát-peroxidázról (APX) és a Cu-Zn szuperoxid-dizmutázról (SOD) állapították meg, hogy a szárazság során fellépő stresszválasz markerfehérjéi.

- **Kadmiumstressz**

A kadmium a műanyag-, a festék- és peszticidgyártás, valamint az akkumulátor-gyártás fontos anyaga, az egyik legtoxikusabb nehézfém. Sajnos a bioszféra nehézfémterhelése, így kadmiumszennyezettsége is többszörösére nőtt az elmúlt évtizedekben. 1999-es adatok alapján éves kibocsátása elérte a 29190 tonna/év értéket (TOPPI és GABBRIELLI, 1999).

A kadmium a legkönnyebben felvehető nehézfém, felvételét befolyásolja: a talajban található kadmiumvegyület típusa és koncentrációja, a talajkémhatás, más elemek (pl. a Zn), a komplexképzők és a szerves humusz jelenléte, a környezeti tényezők (talajhőmérséklet), valamint a növényfaj és a növény kora (SZIGETI, 1998).

A talajokba került kadmium a növények gyökerén és levelén keresztül akkumulálódik, majd jut be a táplálékláncba, ahol az állatok, majd végül az ember egészségi állapotát is veszélyezteti. Ezen kívül műanyag eszközökkel, csomagoló anyagokkal érintkező élelmiszerekkel és a dohányfüsttel is bejuthat a szervezetünkbe, ahol a vesékben raktározódik, és gátolja a cinktartalmú enzimek működését, felborítja a kalcium-foszfor egyensúlyt, ami többek között csonttritkuláshoz vezet. Ezen kívül karcinogén hatását is igazolták már. Japánban részben a rizs magas kadmiumszennyezettségének tulajdonították az egyes helyi közösségekben nagy számban előforduló vesekárosodást, valamint a növekedett elhalálozást a Jinzu folyó mentén (ISHIHARA et al., 2001).

A kadmium legismertebb károsító hatásai a növényi sejtmembránok degradációja, a klorózis és a törpenövekedés (SIMON-SARKADI et al., 2003). A sejtekben a fehérjék aminosav oldalláncain, szulfhidril- és anionos-csoportokhoz kötődve denaturációt okoz, vagy metallotioneinekhez kapcsolódva felhalmozódik, s lassan ürül a szervezetből. A kadmium azáltal gátolja a klorofill-bioszintézist, hogy a protoklorofillid redukáz szulfhidrilcsoportjához kötődik, illetve a fotoszintézisre is több ponton gátló hatással van (fotokémiai rendszer I (PSI) oxidáló oldala, fotokémiai rendszer II (PSII) redukáló oldala, Calvin-ciklus több reakciója) (SZIGETI, 1998). A folyamatos expozíció vagy a környezeti feltételek változása következtében az élőlényekben a fém akkumulálódik (ÁBRAHÁM et al., 1999), és bár nem redox-aktív fémion, oxidatív stresszt okoz (HEGEDŰS et al., 2001).

SIMON-SARKADI és munkatársai (2003) különböző koncentrációjú kadmiumkezelések hatását követték nyomon a búza levélében és gyökerében a tömeg, a hossz, a szárazanyag-tartalom, a kadmiumfelvétel és a szabad aminosav-tartalom változásának vizsgálatával. A különböző dózisu nehézfémstressz következtében a vizsgált paraméterek alapján szignifikáns különbségeket tapasztaltak. A kadmiumos kezelés - a dózistól függően - a levél hosszának és tömegének csökkenéséhez vezetett, nagyobb koncentrációban jobban gátolta a növekedést, kisebb koncentrációban pedig nagyobb fokú regenerálódást figyeltek meg. A búzanövény szabad aminosav-tartalma, - mind a levélben, mind a gyökérben - kadmiumkezelések hatására 1,5-2-szeresére növekedett, mely a regeneráció után további (1,5-szörös) növekedést eredményezett (SIMON-SARKADI et al., 2003).

HAJDUCH és munkatársai (2001) egy rizsfajta (Nipponbare) levelét kezelték különböző, nagy koncentrációjú nehézfémekkel, többek között kadmiummal, és ezek hatását tanulmányozták proteomikai módszerekkel. A kísérletükben igazolták, hogy a nehézfémek a fotoszintézist részlegesen károsították, mivel a ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz (RuBisCO) nagy és kis alegységének drasztikus csökkenését és fragmentációját tapasztalták. Ezen kívül számos - a védekezéssel és stresszel összefüggésbe hozható – fehérje (PR5 és PR10 családok tagjai és a szuperoxid-dizmutáz (SOD)) expressziós változására is kihatással volt a nehézfémkezelés. Továbbá számos növényben azt is megfigyelték, hogy kadmium hatására 10-70 kDa méretű stresszfehérjék expresszálnak (TOPPI és GABBRIELLI, 1999), árpában és kukoricában kadmiumstressz következtében pedig hőstresszre indukálódó Hvhsp 17 gén is kifejeződött (LUPOTTO et al., 1995).

2.2 Proteomika

2.2.1 A proteomika jelentősége

A proteomikatudomány célja: a gén- és a sejtfunkciók közvetlenül a fehérjék szintjén történő megértése, illetve a sejt vagy szövet által expresszált fehérjék analízise és karakterizálása meghatározott kísérleti körülmények között egy adott időpillanatban (WILKINS et al., 1996). Ennek a tudományágnak a kezdete az 1990-es évekre, a hagyományos kétdimenziós elektroforézis elterjedésére tehető. A proteomikára az igazán forradalmasító hatást a tömegspektrometria tette a legújabb technikai vívmányaival. Többnyire a sejt differenciációja, a sejtciklus különböző szakaszai, a növekedés vagy egy külső stimulus hatására bekövetkező változások nyomon követésére használják (GULCICEK et al., 2005).

A fehérjék tanulmányozása nemcsak szükséges, hanem nélkülözhetetlen szerepkörrel bír a funkcionális genomikai kutatásokban (GEISOW, 1998). A proteomika a proteom, vagyis az élő szervezetben előforduló összes - szerkezetében akár a legkisebb mértékben eltérő - fehérje megismerésével foglalkozó tudományterület, amely a genommal kapcsolatos kutatás mintájára, annak kiegészítőjeként jött létre, de ma már a genomikától független, önálló diszciplína.

A proteomika kifejezése az elmúlt években egy kissé kibővült: most már nemcsak a meghatározott körülmények között expresszált fehérjék vizsgálatáról és különböző fajokból és fajtákból származó proteomok összehasonlítását fedi le, hanem funkcionális és strukturális proteomikai vizsgálatokra is széleskörűen használt. A funkcionális proteomika a fehérjefunkciók megértésére szolgál, a fehérjék speciális funkcionális csoportjaik és más molekulákkal történő interakcióinak a feltérképezésével foglalkozik, míg a strukturális proteomika a fehérjék és fehérjekomplexek negyedleges szerkezetének kutatását célozza meg (FIGEYS, 2003).

A Nobel díjas Edmond H. Fischer így nyilatkozik a proteomika jelentőségéről: „A genom szekvenálásával csak következtetni tudunk a képződő fehérjékre, de nem tudhatjuk, hogy hol, mikor és milyen koncentrációban keletkeznek” (FISCHER, 1997).

A genomprojekteknek köszönhetően mára már több élőlény genomjának a nukleotidszekvenciáját ismerjük, következő feladatunk a génfunkciók minél részletesebb megértése a funkcionális genomikai kutatások által (HEITER és BOGUSKI, 1997) a transzkriptomika, a proteomika és a metabolomika eszköztárával (AGRAWAL és RAKWAL, 2006).

Ezzel a megközelítéssel igazán átfogó képet kaphatunk a gének expressziójáról a transzkriptom, a proteom és a metabolom szintjén is mind mennyiségi, mind pedig minőségi szempontból (QURESHI et al., 2007).

A proteomika tudományának igazán nagy jelentősége abban rejlik, hogy a genom és a transzkriptom által kódolt és a fehérjék szintjén megvalósuló jeltovábbítást, szabályozást, enzimatisz aktivitást és szerkezeti funkciókat közvetlenül a proteom szintjén teszi vizsgálhatóvá (QURESHI et al., 2007).

Csak genomikai eszközökkel az expresszált fehérjékről és azok módosultsági állapotáról nem kaphatunk információt (ANDERSON és ANDERSON, 1998.). Ez részben annak is köszönhető, hogy a proteom a genomnál sokkal komplexebb felépítésű. A fehérjék képződésük és funkcionalitásuk megszerzése folyamán érezen mennek át, melynek oka egy poszttranszlációs szabályozás, amely a keletkező fehérje mennyisége és a hírvivő ribonukleinsav (mRNS) szintje közötti korrelációt felborítja (GYGI et al., 1999b). Mai tudásunk szerint több százféle (megközelítőleg 300) kémiai módosulás következhet be a riboszómákon történt fehérjeszintézist követően, mely az adott fehérje funkcióját és helyét is meghatározhatja. Ezen módosítások miatt

a gének számánál nagyságrendekkel több fehérje fordulhat elő a sejtben (GULCICEK et al., 2005).

Az elmúlt években a proteomika vizsgálati lehetőségei olyan mértékben fejlődtek, hogy most már lehetőség nyílik arra is, hogy sejtből, szövetből, biológiai folyadékmintákból származó fehérjéket azonosítani, karakterizálni tudjunk, valamint ezen fehérjék relatív mennyiségét is meghatározzuk. Mindez a különféle tudományterületek - mint a molekuláris- és sejtbiológia, fehérje-/peptidkémia, bioinformatika, analitikai és bioanalitikai kémia, a kromatográfiás és elektroforetikus elválasztástechnikák, valamint a tömegspektrometria - szoros együttműködése és integrációja nélkül nem jöhetett volna létre (GULCICEK et al., 2005).

2.2.2 A proteomika növénybiológiában elfoglalt szerepe

A növénybiológiában az *Arabidopsis thaliana* (L.) és a rizs 2000-ben történő genomszekvenciájának meghatározása hatalmas mérföldkő volt. A genom által nyújtott új információkkal rengeteg kutatási lehetőség és újabb kihívások nyíltak meg a növénybiológia számára a posztgenomika korszakában.

A kutatások legnagyobb hányada a proteomika referencia növényeinek tekintett rizs és lúdfű proteomjának feltérképezésével foglalkozik, mivel ezek génszekvenciája teljes ismert.

A növényi proteomika kezdete az 1990-es évekre tehető, habár növényi fehérjékkel kapcsolatos kísérletek már 1970 óta zajlanak (THIELLEMENT et al., 2002). A gabonanövények közül a publikációk főként a búza (SKYLAS et al., 2001; HORVÁTH-SZANICS et al., 2006), az árpa (GÖRG et al., 1988; FINNIE et al., 2002; FINNIE et al., 2006), a kukorica (GODAY et al., 1988; MÉCHIN et al., 2004) és a rizs (AGRAWAL és RAKWAL, 2006; LEE et al., 2007) proteomjával foglalkoznak.

A proteom analízisa egy nagyon jó eszköz arra, hogy különböző és komplex fehérjetartalmú mintákat összehasonlíthassunk, vizualizálhatóvá tegyünk, és egyes fehérjék specifikus biológiai folyamatokban betöltött szerepét tanulmányozzuk.

Az elmúlt évek proteomikai tanulmányai főként a növényi genom által a szöveti differenciálódás és fejlődés alatt végbemenő fehérjeexpresszió nyomon követésére irányultak, valamint adott szövetekben, sejtekben, sejtservecskében kifejeződött fehérjék vizsgálatára korlátozódtak (KRISTOFFERSEN és FLENGSRUD, 2000; THIELLEMENT et al., 2002).

A búza szemtermésének proteomikai vizsgálatai a kezdetben a fajták megkülönböztetésére irányultak (DUNBAR, 1985), melyet az endospermium proteomjának részletes feltárása követett (SKYLAS et al., 2001; ISLAM et al., 2002). Ezen felül megvizsgálták a fehérjeszintű változásokat a búza szemtermés fejlődése során, melyet összevetve az érett gabona

szemterméséből származó fehérjemintázattal, 250 fehérjét azonosítottak a fejlődő endospermiumból (VENSEL et al., 2005).

A rizs kapcsán az első proteomikai kísérletek az embrió és az endospermium fehérjeit tanulmányozták (KOMATSU et al., 1993), melyet az egyes növényi részek (levél, gyökércsúcs, hajtás, szemtermés, pelyva, korpa) proteomikai vizsgálatával bővítettek ki (TSUGITA et al., 1994, 1996). KOLLER és munkatársai (2002) 2528 fehérjét azonosítottak, melyből 877 származott a rizs szemterméséből, a fennmaradó rész pedig a levél és a gyökér proteomját karakterizálta. Ezen felül pedig született néhány olyan publikáció is, mely például a jázmonsav szerepére kereste a választ a rizs védekezési jelrendszerében (RAKWAL és KOMATSU, 2000).

2.3 A proteomikában használatos vizsgálati módszerek

2.3.1 Az elektroforézis alkalmazása a fehérjék elválasztásában

Az elektroforézis több mint 100 évet felölelő története igen gyors fejlődést és sokrétű alkalmazási területet jelez. Az elektroforézisnek, mint elválasztási módszernek az az alapja, hogy a töltéssel rendelkező vegyületek az elektromos mező hatására elmozdulnak. A fehérjék amfiprotikus molekulák, ezért frakcionálásukra és szerkezetváltozásuk nyomon követésére az elektroforetikus módszerek rendkívül alkalmasak (HAJÓS és IDEI, 2001). Az elektroforézis első irodalmi megemlézése LODGE (1886) téziseiből származik.

A modern elektroforetikus technikák születése 1937-re tehető, amikor TISELIUS (1937) elsőként leírta a szabad folyadékfázisban mozgó ionok alapelveire épülő, a mozgó határfelületek technikájának lelkét alkotó U-cső működését, melyért 1948-ban Nobel-díjat is kapott. Az elektroforézis történetében a másik kiemelkedő esemény az volt, amikor Svensson 1959-ben megalkotta az izoelektromos fókuszálás alapelméletét (HAJÓS és IDEI, 2001).

A mozgó határfelületek módszere volt történetileg az első, kidolgozott és széles körben alkalmazott elektroforetikus technika. E megoldás alapja az, hogy a részecskék vándorlása szabadon, oldatban megy végbe az elektromos erőter hatására. Az eljárást hamarosan felváltották a hordozó közeget tartalmazó elektroforetikus módszerek. Kötött elektroforézisnek vagy zóna-elektroforézisnek nevezik e stabilizált elektrolittal működő technikát. Az alkalmazott számos hordozó anyag egy része inert, áramlásgátló és kizárólag hordozó szerepet játszik. A hordozó közeg gyors térhódítását az a rendkívüli előnye biztosította, hogy csökkenti az áramlással kapcsolatos inhomogenitásokat és a diffúziót oly mértékben, hogy az elválasztott komponensek a maximális felbontóképességnek megfelelő legélesebb zónákat eredményezik.

Az izotachoforézist állandó sebességű ion-vándorlásnak vagy eltolódásos elektroforetikus módszernek is nevezik. Ez az elektroforetikus technika a molekulákat töltés-különbségeik alapján választja el, többnyire nem gélszűrésre alkalmas közegben. Az analitikai elválasztásoknál folyadékkal töltött kapilláris csöveket, poliakrilamid gél hengereket vagy réteget használnak.

A fehérjék, illetve peptidek hagyományos poliakrilamid gélelektroforézissel való elválasztása a töltésüktől és a méretüktől egyaránt függ. Ha a poliakrilamid gélelektroforézist nátrium dodecil-szulfát (SDS) jelenlétében végezzük, akkor az elválasztás kizárólag a molekula méretétől függ. Az SDS a részecskéket negatív töltésfelhővel úgy burkolja be, hogy a polipeptidek jellegzetes saját töltése nem juthat érvényre. Az SDS egységnyi polipeptidhez alkalmazott mennyisége jelentős szerepet játszik az elválasztásban (DELINCÉE és HAJÓS, 1984). A poliakrilamid gél különleges előnye az, hogy a gélek összetétele az akrilamid és az N,N'-metilén-bisakrilamid aránnyal az igényeknek megfelelően jól ellenőrizhetően változtatható. A pórusméret az akrilamid koncentráció növekedésével csökken. A poliakrilamid gélelektroforézist - SDS jelenlétében - nem csupán a fehérjék molekulatömegének meghatározására használják, hanem addig ismeretlen fehérjék detektálására és bioszintetizált fehérjék azonosítására, kvantitatív kimutatására. A poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE és SDS-PAGE) jelentős szerepet játszik az élelmiszeranalitikában, ahol fehérjék azonosítására, idegen fehérjék kimutatására, fajta-vizsgálatokra és fehérjék szerkezetében bekövetkező változások nyomon követésére egyaránt alkalmazzák.

Egyes árpafajtákat hordein fehérjék elektroforetikus mintázata alapján COOKE (1984) akart megkülönböztetni elektroforetikus módszerek használatával - mint savas és bázikus elektroforézis, SDS PAGE és izoelektromos fókuszálás (IEF) -, de az egyes árpafajtákat a hordein mintázatuk alapján csak fő csoportokba tudta osztani. Ezt követően SHEWRY munkatársaival (1985) 164 árpafajta hordein fehérjéit elektroforetikus mintázatuk alapján 32 csoportba sorolták, melyet később a hordein fehérjék molekulatömege és aminosav-tartalma alapján négy csoportra csökkentettek, melyek "A", "B", "C" és "D" hordein elnevezést kapták. A "B" és "C" hordeint az árpafajták elektroforetikus módszerekkel történő azonosítására és megkülönböztetésére használták fel. NIELSON és JOHANSON (1986) a dán árpafajtákat már az enzim és izoenzim mintázatuk alapján próbálták megkülönböztetni, mely próbálkozás sikerrel járt, hiszen 66 árpafajtából 33-at tudtak azonosítani. Azonban módszerük a többféle gélrendszer és festési mód alkalmazása miatt túl munkaigényes megoldásnak bizonyult és nem is terjedt el.

2.3.1.1 Kétdimenziós elektroforézis (2-DE)

A proteomikának több analitikai eszköze is van, de már évek óta a 2-DE a legelterjedtebb szeparációs technikája, mely annak köszönhető, hogy a 2-DE gélek nagy felbontóképességgel rendelkeznek és képesek egészen komplex fehérje minták elválasztására is. A szeparáció során kapott fehérjefoltok pedig könnyedén vizualizálhatóak és tömegspektrométerrel azonosíthatóak. A 2-DE pozitívumai mellett azonban néhány negatívummal is bír (mint például a nagy idő és munkaigénye), melyek miatt az utóbbi években az úgynevezett gélmentes, folyadékkromatográfiás módszerek is színre léptek a fehérjék nagyhatékonyságú elválasztására. Ezen módszerek a 2-DE alternatív módszereinek, vagy pedig az azt kiegészítő módszereknek tekinthetők.

A 2-DE technikája két elektroforetikus folyamatból, vagyis az első dimenziót adó izoelektromos fókuszálásból (IEF) és az azt követő második dimenzióból, a molekulatömeg szerinti elválasztásból tevődik össze. A technikát először 1969-ben írta le MACKO és STEGEMANN (1969) burgonya fehérjéinek vizsgálatára (1969), de igazán sikeresen KLOSE (1975) és O'FARRELL (1975) tudták alkalmazni már egy sokkal hatékonyabb minta-előkészítési procedúrával. A 2-DE rengeteg apró lépése mind kihatással van a kapott fehérje mintázatra, mely a kísérletek reprodukálhatóságát erősen befolyásolja. ANDERSON és ANDERSON (1978) a 2-DE reprodukálhatóságának javítása érdekében fejlesztette ki az ISO-DALT néven ismertté vált rendszert, mely több gél egyszeri öntését és futtatását tette lehetővé. Ezen erőfeszítést a rögzített pH-gradiens megalkotása követte BJELLQVIST és munkatársai (1982) által, akik a gél polimerizációja alatt a pH-gradienst alkotó akrilamid pufferek akrilamid mátrixhoz történő kovalens kötésével jelentős problémákon lettek úrrá. Többek között a carrier ampholitok gyártási tételenkénti eltérése, valamint a minták eltérő fehérje- és sótartalma által okozott pH-gradiens eltolódás és így a nem megfelelő izoelektromos fókuszálás problémáját sikerült megoldaniuk.

A 2-DE-t az árpa proteom vizsgálatára elsőként SHEWRY és munkatársai (1983) alkalmazták az alkoholban oldható hordein frakció vizsgálatára, majd pedig GÖRG és munkatársai (1988), HURKMAN és TANAKA (1988), valamint FLENGSRUD és KOBRO (1989) vizsgálatai bővítették az árpa fehérjéivel kapcsolatos ismereteket. A technikát később kiterjesztették az endospermium vízdoldható fehérjéinek (KRISTOFFERSEN és FLENGSRUD, 2000) és a főként keményítőszemcsékhez kötődő tartalék fehérjék vizsgálatára (WEISS et al., 1991; DARLINGTON et al., 2000).

Napjainkban a kétdimenziós elektroforézist a növénybiológiában egyrészt a növény fejlődése és különböző biotikus és abiotikus stresszhatások génexpressziós változásainak fehérjék szintjén történő vizsgálatára, másrészt genetikai különbségek és filogenetikai kapcsolatok

megállapítására használják (THIELLEMENT et al., 2002). Ezen kívül segítségével poszttranszlációs változások (PTM) bekövetkezését is figyelemmel lehet kísérni, hiszen ezek a fehérjék töltésére és molekulatömegére is kihatással vannak (AGRAWAL és RAKWAL, 2006).

- **Izoelektromos fókuszálás**

A 2-DE első dimenziója, az IEF során a fehérjék a pH-függő zero töltésüknek megfelelően, vagyis izoelektromos pontjuk alapján szeparálódnak, és az izoelektromos pontjuknak megfelelő helyen a gélben éles sávot adnak. A fókuszálás egy immobilizált pH-gradiensben (IPG) történik, melyet különböző pufferoló komponensek generálnak, amik kovalensen kötődnek a porózus poliakrilamid gélekhez (CORBETT et al., 1994). Ezen immobilizált pH-gradiensek egészen széles pH-tartományban –pH 2,5-től pH 12-ig- rendelkezésre állnak, és kereskedelmi forgalomban hozzáférhetőek. Az IPG gélcsíkokra felvihető fehérje mennyisége 100-500 µg között változhat, a pH-gradiens szélességétől, a szeparációs út hosszától, a fehérjeminta komplexitásától, valamint az alkalmazott festési módszertől függően. A fehérjék pH-gradiensben történő IEF szeparálása magas feszültségen több órát vesz igénybe, ahol az áramerősség értéke általában 50 µA/IPG gélcsíkra korlátozódik. A futtatás első szakaszában alkalmazott 50-100V feszültség a nagy sókoncentrációjú minták sómentesítését szolgálja, míg a magasabb feszültség (>3500V) már a fehérjék elválasztásához szükséges. A fókuszálási idő egyik kritikus pontja a szeparálásnak, hiszen túl rövid ideig történő fókuszálás horizontális csíkozottságot eredményez a gélen, a túl hosszú pedig víz lecsapódását okozza a gélcsíkok felületén (GÖRG et al., 2000).

- **SDS-PAGE**

A 2-DE második dimenziója az SDS-PAGE, mely a fehérjéket molekulatömegük alapján szeparálja. A második dimenziót megelőzően az IPG gélcsíkok két lépésben equilibrálhatóak abból a célból, hogy az SDS-sel teljes mértékben kölcsönhatásba kerüljenek. Az equilibrálás első lépéseként DTT-t, majd a második lépésében iodoacetamidot kell adni. Ezt követően pedig megtörténhet a molekulatömeg szerinti elválasztás a gélcsíkok horizontális vagy vertikális SDS tartalmú gélekre helyezésével (GÖRG et al., 2000).

A kétdimenziós elektroforézist követően az elválasztott fehérjéket láthatóvá kell tenni a gélen. Erre a célra univerzális vagy specifikus festési módszerek állnak rendelkezésre. A legáltalánosabban használt univerzális festékek a Coomassie Brilliant Blue (CBB), az ezüsfesték és a fluoreszcens festékek (Sypro Ruby, DIGE). A különböző festési módok szenzitivitásukban, dinamikus tartományukban, reprodukálhatóságukban és tömegspektrometria (MS) alapú

technikákkal való kompatibilitásukban térnek el egymástól. Ez utóbbi célra a leginkább használható festék a CBB, ugyanakkor az ezüst és a fluoreszcens festékek érzékenyebben festik a fehérjéket. A CBB érzékenysége 10-100 ng fehérje (PATTON, 2002). A specifikus festési módok a fehérjék poszttranszlációs módosulásainak (glikolizáció, foszforiláció stb.) detektálására szolgálnak közvetlenül a kétdimenziós gélben vagy blottolást követően egy immobilizált membránon. Ide tartoznak az például az antitestek, lektinek vagy egyes fluoreszcens festékek, mint például a ProQ Diamond a foszforilált fehérjék megfestésére (GÖRG et al., 2004).

A kétdimenziós gélek információ tartalmának növelése érdekében fejlesztették ki UNLU és munkatársai (1997) a differenciál kétdimenziós gélelektroforézist (DIGE), mely során két forrásból származó, különböző fluoreszcens festékekkel kovalensen jelölt fehérje mintát összekevertek és egy gélen futtattak. A különbözőképpen expresszált fehérjék könnyedén megkülönböztethetőek, így az összehasonlító proteomikának a DIGE egy kiváló eszköze. A növények közül első ízben paradicsom fehérjeinek vizsgálatára próbálták ki ROSE és munkatársai (2004).

- **A minta előkészítése**

A kétdimenziós elektroforézis előnyei között számon tartott nagy felbontóképesség eléréséhez megfelelő mintaelőkészítést kell alkalmazni, ahol a minta vizsgálni kívánt fehérjei megfelelően oldott állapotuk mellett redukált állapotban is vannak, valamint aggregátumokat nem tartalmaznak. Csak megfelelő minta-előkészítéssel érhetjük el az egyedi, aggregáció nélküli polipeptidek elválasztását (GÖRG et al., 2004).

A sejtek feltáráskor az ozmotikus, detergenssel történő, vagy enzimatisz lízis közül választhatunk, de ezenkívül használhatunk ultrahangot, nagy nyomással történő kezelést, valamint homogenizációt. A sejtízis folyamán számos olyan proteolitikus enzim, só, zsír, nukleinsav, poliszacharid szabadul fel, mely a fehérjék izoelektromos pontjuk alapján történő szeparációjára zavaró hatással van. E zavaró anyagok eltávolítását is meg kell oldani: pl. dialízissal a sómentesítés érdekében, valamint zsírtalanítást is lehet használni a lipid eltávolításához, és acetont a fehérjék kicsapása céljából. A növények ebből a szempontból különösen problematikusnak számítanak, hiszen nagyon sok proteázt és számos olyan komponenst is (sejtfal polifenoljai, valamint poliszacharidok, rostok, lipidek és számos másodlagos anyagcsere-termékek) tartalmaznak, melyek a proteomikai analízisre zavaró hatással vannak. Ezen komponensek eltávolítására és a fehérjék kicsapása céljából széles körben használják a triklór-ecetsav (TCA) és aceton kombinációját (WATSON et al., 2003), valamint a

fehérjék oldatba vitelére a fenolos extrakciót és az azt követő metanolos vagy ammónium-acetátos kicsapást (HAJDUCH et al., 2005).

A fehérjéket az eredeti töltésük megtartása mellett kell a mintaelőkészítés során oldatba vinni és mindenféle inter és intramolekuláris kapcsolattól megszabadítani. A minta feloldása 2-DE esetén általában chaotropokat, detergenseket és redukáló ágenseket tartalmazó pufferekben történik. Chaotropként a legtöbb esetben ureát és thio-ureát használnak, melyek az inter- és intramolekuláris kölcsönhatások felbontásában nagyon hatásosak. A tio-urea különösen a hidrofób molekuláris kapcsolatok felbontásában hatékony, de felhasználása kis vízóldékonysága miatt limitált. Így a fehérjék feloldására vagy csak 9 M ureát használnak, vagy 5-7 M ureát 2M thio-urea kombinációjával. Az urea vizes oldatokban ammónium-izocianáttal fordul elő, mely a fehérjék aminosortjával lép reakcióba, és csökkenti a fehérjék oldékonyságát. Az ammónium-izocianát eliminálása érdekében hordozó amfolitot adnak a minta pufferébe (GÖRG et al., 2004).

A fehérje alegységek közötti hidrofób kölcsönhatásoknak, valamint a fehérjék aggregációjának és kicsapódásának megakadályozása érdekében detergenseket használnak a mintapufferben. A 2-DE-ben egy közismerten használatos anionos detergens az SDS, melyet csak nagyon alacsony koncentrációban (0,2%) alkalmaznak. Nem ionos és ikerionos detergensek közül a NP-40, a Triton X-100 és a CHAPS terjedtek el a fehérjék oldatba vitelére.

Redukáló ágenseket a diszulfid kötések redukciója és az újra oxidáció elkerülése érdekében kell használni. Erre a célra feleslegben ditiotritol (DTT) vagy ditioeritritol (DTE) használata javallott (GÖRG et al., 2004).

- **A kétdimenziós elektroforézis gyenge pontjai**

Annak ellenére, hogy a kétdimenziós elektroforézist nagy felbontó képesség jellemzi, van néhány olyan hátrányos tulajdonsága is, mely egy átfogó, az adott proteomot jellemző teljes információnak gátat szab. Az egyik ilyen gyenge pontja az, hogy csak azon izoelektromos pontú fehérjék detektálhatóak a segítségével, melyek a gyártó cégek által hozzáférhető IPG-gélcsíkok pH tartományába esnek. Az IPG-gélcsíkok elég széles, így például pH 3-10 intervallumban is rendelkezésre állnak, de a szélső értékekhez közeli izoelektromos pontú fehérje (pH 4 alatt, vagy pH 8 felett) csak ritkán detektálható a kétdimenziós gélen (GÖRG et al., 2004).

Ezen kívül a kétdimenziós gélek dinamikus tartománya kicsi, ami azt jelenti, hogy a kis mennyiségben jelenlévő fehérjék csak nehezen detektálhatóak. Ennek kiküszöbölésére kis pH-tartományt átfogó IPG-gélcsíkokat lehet használni, melyekre nagyobb fehérjemennyiség vihető fel. Így a mintában kisebb mennyiségben jelenlévő fehérjék is láthatóvá tehetők. Az

érzékenységet a szűkebb pH-tartományú gélcsíkok használata mellett, még egy, a minta-előkészítésbe beiktatott előfrakcionálási lépéssel is növelhetjük (GYGI et al., 2000).

Meg kell jegyezni továbbá azt a tényt is, hogy a hidrofób vagy membránfehérjék, melyek akár a sejtben előforduló fehérjék 30%-át is kitehetik, a kétdimenziós elválasztásokban nagyon alul reprezentáltak. Ez részben annak köszönhető, hogy nehezen oldódó fehérjékről van szó, melyek aggregátumok képzésére is hajlamosak. Így már a minta előkészítése folyamán, majd a fókuszálás lépésében és a kétdimenziós gélbe történő átvitel során is elveszhetnek. Ezen probléma kiküszöbölésére célszerű a mintaoldó pufferbe tio-ureát és többek között amidoszulfobetain-14-et (ASB-14) adagolni (MOLLOY, 2000) és mindezt egy intenzív extrakcióval (MOLLOY et al., 1998) vagy pedig egy előfrakcionálással kombinálni (STASYK és HUBER, 2004).

2.3.2 A proteomika egyéb nem gél alapú vizsgálati módszerei

A proteomikában a kétdimenziós elektroforézis egyik alternatívája a folyadékkromatográfia, mely elsősorban nagy felbontó képessége, jó reprodukálhatósága, valamint tömegspektrometriás módszerekkel való kompatibilitása következtében terjedt el széleskörűen (SHI et al., 2004).

A gabonafehérjék elválasztására 1970-es években kezdték el használni a folyadékkromatográfiás módszereket. A proteomikában leginkább fordított fázisú folyadékkromatográfiás elválasztási módot alkalmaznak tömegspektrometriás kompatibilitása és viszonylag komplex fehérjeminták elválasztásában nyújtott teljesítménye miatt.

A kétdimenziós folyadékkromatográfiában (2-D-LC) két kromatográfiás módszert, főként az ion cserélő kromatográfiát és a fordított fázisú folyadékkromatográfiát kombinálják a fehérjék vagy peptidek még nagyobb mértékű felbontása érdekében. Így komplex protein mintákból több száz fehérje azonosítása is lehetővé válik (NÄGELE et al., 2004).

A kapilláris elektroforézis számos elektroforetikus technikából kifejlesztett módszer, melynek során a komponensek elektroforetikus elválasztása egy kapilláris csőben játszódik le (HAJÓS, 1992). A kapilláris elektroforézis mint szeparálási technika rendkívül hatékony. Elvileg a módszer igen sokféle molekula elválasztására és detektálására alkalmas (CHENG és DOVICH, 1988). A kapilláris elektroforézist a fehérjeanalízisben, illetve a peptid-térkép, a „fingerprint” meghatározásában használják, ami minden fehérjére sajátosan jellemző (COBB és NOVOTNY, 1989). A kapilláris elektroforézist egyes maláta fajták, valamint maláta, karamell és pörkölt maláta megkülönböztetésére alkalmazták (ROYLE et al., 2002).

Egy további lehetőség a fehérjék azonosítására a multidimenziós fehérje azonosító technológia (MudPIT), melyben a peptidek egy kétfázisú kétdimenziós folyadékkromatográfiás

készülékben szeparálódnak, amit közvetlenül egy tandem tömegspektrométerhez kapcsolnak. A peptidek elválasztására szolgáló oszlop egy szilika nanospray hegyben helyezkedik el és erős kationcserélő, valamint fordított fázisú töltetből álló zónákból tevődik össze. Növények közül elsőként rizs fehérjéinek elválasztására használták (KOLLER et al., 2002). A nagy felbontása, kiváló érzékenysége mellett azonban ennek a technikának is megvan a maga hátránya, hiszen mennyiségi adatok nem nyerhetők ki vele és komplex proteomok megkülönböztető analizálására sem alkalmas.

A nem gél alapú vizsgálati módszerek esetében a fehérje mennyiségi meghatározására a legtöbb esetben a fehérjéket izotópokkal jelölik meg mind *in vivo*, mind pedig *in vitro* modellekben (AEBERSOLD és MANN, 2003). *In vivo* módszerekben a baktérium vagy élesztő ^{14}N vagy ^{15}N -t tartalmazó táptalajban nő, vagy pedig stabil izotópot tartalmazó aminosavat építenek be a fehérjébe (SILAC) (ONG et al., 2002). *In vitro* módszerek esetében pedig a fehérjéket vagy peptideket kémiai derivatizálással jelölik, pl. acilezik vagy észterezik (ONG et al., 2003). Egy további nagyon ígéretes módszer a GYGI és munkatársai (1999a) által kifejlesztett „izotóppal jelölt affinitáscímkék” (ICAT) technika. Az ICAT-ot búza magjából származó fehérjék vizsgálatára használták már (ISLAM et al., 2003).

Az eddig felsorolt módszerek a fehérjék relatív mennyiségi meghatározását szolgálják. Ezen kívül van lehetőség abszolút mennyiségi meghatározásra is az AQUA nehézpeptidekkel. A módszert STEMMANN és munkatársai (2001) fejlesztették ki 2001-ben. A technika alapja a szintetikus peptidláncon belül lévő aminosavak stabil, nem radioaktív ^{13}C vagy ^{15}N izotópokkal való jelölése, melyek alkalmasak belső standardként tömegspektrometriás és mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR) vizsgálatokban a mennyiségi értékelésre. A normál peptidek és a nehézpeptidek fizikai és kémiai tulajdonságaikban megegyeznek. Egyetlen különbség közöttük a nehézpeptidek tömegkülönbségéből és így az eltérő tömeg/töltés (m/z) értékből adódik (STEMMANN et al., 2001).

A rekombináns fehérje termeltetés és az ezt követő fehérjetisztítás elterjedése eredményezte a fehérje microarray vagy fehérje mikrolemez technológia tekintélyes fejlődését. Már növényi fehérjék vizsgálatára is fejlesztettek ki mikrolemezt, mely felületére elsőként az *Arabidopsis thaliana* 96 különböző fehérjéje ellen kifejlesztett mono- és poliklonális antitesteket kötöttek (KERSTEN et al., 2003). Fehérje chippel kísérletet első ízben egyszikű növények közül árpával végeztek az árpa fehérje-kináz és kazein-kináz IIa célfehérjéinek feltérképezésére (KRAMER et al., 2004).

A nem gél alapú fehérje elválasztási módszerek egy része kiválóan alkalmas komplex fehérjeminták preparatív célú egy- vagy kétdimenziós frakcionálására. Erre azért is van nagy szükség, hiszen a sejt teljes proteomja nagyon komplex. Többféle fehérjét tartalmaz, melyek

eltérnek mennyiségükben, izoelektromos pontjukban, hidrofóbicitásukban és relatív molekulatömegükben. Csupán egyetlen elválasztási technika alkalmazása nem enged betekintést a proteom teljességébe. Sok esetben előzetes frakcionálásra van szükség, mellyel sikeresen csökkenthetjük a mintánk komplexitását és ezzel együtt az elválasztásunk felbontását és érzékenységét is növelhetjük. Napjainkban az egyes komplex fehérjeminták preparatív célú frakcionálására a Rotofor CellTM (Bio-Rad) és a Free Flow Electrophoresis (Becton Dickinson) elnevezésű preparatív folyadék fázisú izoelektromos fókuszáló készülékeket és a PF2DTM (Beckman Coulter) nevű kétdimenziós preparatív folyadék kromatográfiás műszert használják. A folyadék fázisú előfrakcionálás hasznosságát és élelmiszertudományi felhasználhatóságát az is bizonyítja, hogy a Központi Élelmiszer-tudományi Kutató Intézetben a Budapesti Corvinus Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszékének együttműködésével a Rotofor CellTM készüléket sikeresen alkalmaztuk az *Agaricus bisporus* szelénrel dúsított változatának kalapjából kivont vízdoldható fehérjék IEF alapján történő előfrakcionálására (GERGELY et al., 2004).

2.3.3 Fehérjeazonosítás tömegspektrometriával

A tömegspektrometria (MS) -mely 93 éves múltta tekint vissza- a szerves vegyületek legérzékenyebb, legnagyobb hatékonyságú szerkezetvizsgáló és analitikai eszköze, melyet a természettudományok, az ipar, a mezőgazdaság, a környezet- és egészségvédelem valamennyi területén alkalmaznak. Használata mára a proteomika egyik nagyon fontos alappillérvé vált (AGRAWAL és RAKWAL, 2006).

A tiszta, azonos molekulákat tartalmazó proteinpreparátum aminosavsorrendjének (primer szerkezet) meghatározása az első, Edman-lebontás alapján működő szekvenátorok megjelenése óta vált automatizálható, nagy hatékonyságú eljárássá. 1972-ben húsz fehérje primer szerkezetét ismerték, két évtizeddel később 20 000 protein aminosavszekvenciáját őrizték az adatbázisok. Az újabb, ugrásszerű változás a tömegspektrometriás módszer megjelenésével van összefüggésben. Érdemes megjegyezni, hogy a 2002. évi kémiai Nobel-díjat megosztva John B. Fenn (Virginia Commonwealth University, Richmond, USA) és Koichi Tanaka (Shimadzu Corporation, Kiotó, Japán) nyerte el a „biológiai makromolekulák tömegspektrometriás vizsgálatára” kidolgozott ionizációs technika megalkotásáért. Az MS jelentősen csökkenti a vizsgálatához szükséges anyagmennyiséget és a tömegmérés pontossága miatt növeli a kísérleti adatok megbízhatóságát. Az MS a molekulák (atomok) ionizációján, majd a képződött ionok relatív tömegének meghatározásán alapuló, nagy hatékonyságú szerkezetvizsgáló és analitikai módszer. Kiemelkedő szerepét nagy érzékenysége (kvalitatív kimutathatósági határ: 10^{-12} - 10^{-16} g), széles tömegtartománya (1 - 10^6 relatív tömegegység), a mért értékek specifikitása és

reprodukálhatósága, alacsony minta igénye ($\sim\mu\text{g}$ $\sim\text{pg}$), valamint az elválasztás-technikai módszerekkel való kombinálhatósága (gázkromatográfia – tömegspektrometria (GC/MS); folyadékkromatográfia – tömegspektrometria (LC/MS); kapillár-elektroforézis – tömegspektrometria (CE/MS)) biztosítja (DINYA, 2001).

A tömegspektrométerek feladata a bejuttatott minták ionizációja, a képződött ionok elválasztása tömeg/töltés (m/z) hányadosuk alapján, valamint a szétválasztott ionok detektálása a kapott elektromos jelek számítógépes feldolgozása és az eredmények megjelenítése révén.

Tömegspektrometriás technikákkal elvileg bármilyen halmazállapotú, egy vagy többkomponensű anyag vizsgálható. A mintabeviteli technika szervesen összefügg az alkalmazott ionizációs módszerrel, az analizátor típusával, de mindenekelőtt a vizsgált vegyület/anyag sajátosságaival (DINYA, 2001). Az ESI 1988-as és a MALDI 1985-ös MS-sel kombinált kifejlesztését követően ezen tömegspektrometriás ionizációs technikák a fehérje és peptid azonosítás és karakterizálás alapvető eszközeivé váltak. A legszélesebb körben fehérjeazonosításra a mátrix segített lézer deszorpció/ionizáció - repülési idő - tömegspektrométert (MALDI-TOF-MS) (SHEVCHENKO et al., 2000; AEBERSOLD és MANN, 2003), és a folyadék kromatográfia tandem tömegspektrométert használják (LC-MS/MS) (AEBERSOLD és MANN, 2003).

2.3.3.1 Q-TRAP elektroporlasztásos tandem tömegspektrometria

Az elektroporlasztásos (elektrospray, ES) technikával történő ionizációt Doel és kollégái írták le 1968-ban, de első ízben John Fenn kapcsolta össze ezt az ionizációs technikát a tömegspektrométerrel (YAMASHITA és FENN, 1984). A elektroporlasztásos ionizációnál (ESI) a mintát tartalmazó folyadékarám egy fém kapillárisba kerül, melyre 3-5 kV feszültség van kapcsolva. A kapilláris hegye és az ellen-elektród között erős elektrosztatikus tér jön létre. Az elektrosztatikus tér hatására a kapilláris végén lévő folyadék felszínén töltés-többlet képződik, így a kapillárisból kilépő folyadék kúpszerűen kicsúcsosodik (Taylor-kúp) s a csúcásáról töltéssel rendelkező folyadékcseppecskék szakadnak le. A folyadékcseppek a minta mellett még jelentős mennyiségű oldószert és vizet tartalmaznak. Az oldószer mennyisége egy fűtött kapillárison történő átvezetés következtében csökken, így a méretük csökkenésével felületi-sűrűségük nő, a cseppek instabilak lesznek, eléri a Rayleigh-féle instabilitási határt és bekövetkezik a Coulomb robbanás, a cseppecskék kisebb cseppekre szakadnak. A folyamat végén a minta szolvatált/hidratált protonált ionjai (MH^+) jelennek meg a gáz fázisban (DINYA, 2001).

A Q-Trap hibrid tömegspektrométert az MDS Sciex/Applied Biosystems mutatta be 2002-ben (HAGER, 2002). A Q-Trap rendelkezik egy oszcilláló (RF) kvadrupóllal (Q_0), amely az

ionokat az analizátor felé továbbítja. Az első kvadrupól egy oszcilláló/egyenáramú (RF/DC) kvadrupól tömeg filter, míg az azt követő kvadrupól (Q2) ütközési cellaként működik. A Q3 kvadrupól vagy hagyományos üzemmódban, vagy pedig egy lineáris ion csapdaként (LIT) képes működni. Az ionok a csapdában RF változó áram hatására torlódnak, rezegve körbe mozognak. Egyenáram (DC) hatására pedig tengely irányában a terminális lencse felé mozdulnak és kijutnak a lineáris ion csapdából (HAGER, 2004).

2.3.3.2 Mátrix által segített lézer deszorpciós ionizáció repülésidő tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS)

A mátrix által segített lézer deszorpciós ionizáció (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) technikát Karas és Hillenkamp fejlesztette ki a 80-as évek végén főként fehérjék és peptidek karakterizálása céljából (KARAS és HILLENKAMP, 1988). Ők voltak azok, akik elsőként alkalmazták a lézer deszorpciót és ionizációt egy lépésben és a kifejlesztett MALDI forrást repülési idő (time –of-flight, TOF) analizátorhoz kapcsolták.

A mátrix által segített lézer deszorpciós ionizáció során a mintát feloldjuk egy olyan szerves mátrixban, ami az alkalmazott nitrogén lézer 337 nm vagy Nd-YAG lézer 355 vagy 266 nm hullámhosszánál nanoszekundumnyi időtartamú lézer impulzusok hatására erős fényelnyelést mutat. Biokémiai alkalmazásra szinte kizárólag az α -ciano-4-hidroxi-fahéjsavat, a 2,5-dihroxi-benzoésavat, 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-fahéjsavat (szinapik sav) és a hangyasavat használják (HILLENKAMP et al., 1991).

A MALDI pontos folyamata még nem ismert, eddig csak hipotézis van arra, hogy a lézer impulzusok hatására robbanásszerűen szilárdanyag (minta+mátrix) elpárologás történik, melyben a minta molekulák szeparáltan gőzfázisba lépnek át. A szilárd felületet érő lézer fotonok döntő többségét a mátrix molekulák adszorbeálják, mely folyamatot elsődleges ionizációnak hívják. Ennek időtartama kb. 2 ns. Ezt követően pedig megtörténik a másodlagos ionizáció a protonált mátrix molekula és a minta molekula között proton transzfer útján. Ez a lézer impulzust követően kb 35-70 ns-al játszódik le (ZENOBİ és KNOCHENMUSS, 1998). A mátrix molekulák segítik a gázfázisban a minta molekulák ionizációját proton vagy kation átadással, vagy proton elvonással. A folyamat során így protonált vagy deprotonált kvázi molekulaionok képződnek, melyek az analizátorba jutnak be.

A MALDI és ESI ionizációs technikák kíméletes ionizációs technikáknak tekinthetők, mivel az ionizáció során a minta nem, vagy legalábbis csak kis mértékben bomlik el. Így hőre érzékeny, nagy moltömegű biomolekulák, akár 300000 Da méretű fehérjék vizsgálatát teszik lehetővé. A MALDI kevésbé érzékeny a sókra és egyéb szennyeződésekre, mint az ESI.

Femtomolnyi mennyiségeket is képes érzékelni. Manapság leginkább a proteomikában használják peptidek térképezésére és szekvenálására (JONSSON, 2001).

A MALDI tömegspektrometriában a tömeg/töltés (m/z) analízis céljára a repülésidő (TOF) analizátor egy időben képes regisztrálni valamennyi iont, melyek egy lézer pulzus hatására képződnek. A lézeres ion-képzés, a MALDI technika, ion „tükör”-rel kombinálva, ma az egyike a legfontosabb tömegspektrometriai technikáknak (DINYA, 2001).

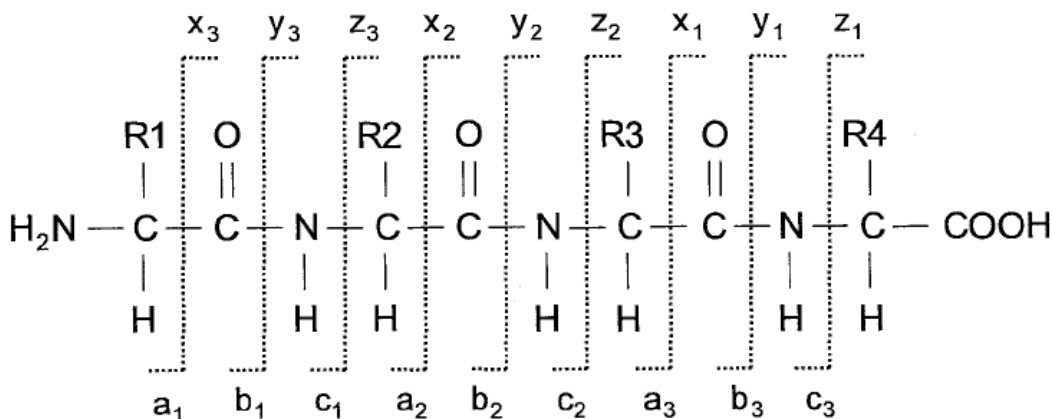
Az impulzus üzemmódban működő ionforrásból gyorsítás után impulzusszerűen lépnek ki az ionsomagok a vákuum alatt lévő, térmentes repülési csőbe és haladnak a detektor felé. Valamennyi ion, azonos t_0 időpillanatban, azonos kinetikus energiával lép be a repülési térbe és a repülési idejük a detektorig a tömegüktől függ (DINYA, 2001).

2.3.3.3 Peptidtömeg ujjenyomat

A tömegspektrométerrel történő fehérje analízishez és azonosításhoz a kétdimenziós gélből az azonosítandó fehérjét ki kell vágni, majd mosni és enzimatis emésztésnek (többnyire tripsinnel) kell kitenni peptidek képződése céljából. Ezt követően az így kapott peptidkeverékből peptidtérkép készül, melyben a peptidfragmensek tömegének az ujjenyomatát (PMF) láthatjuk. A kétdimenziós elektroforetikus elválasztásból származó fehérjék gyors azonosításához ezen peptidtömeg ujjenyomatot általában MALDI TOF MS segítségével kapjuk meg. Ezt követően pedig speciális szoftverek, úgymint MASCOT vagy MS-fit áll rendelkezésre, hogy a kapott peptidtömegeket az adatbázisban fellelhető fehérjék elméletileg elvárt triptikus peptidjeinek megfelelő tömegekkel hasonlítsuk össze. Az összehasonlítást követően a tömegük pontosságától és a fehérje szekvenciák egyezésének fokától függően sok-sok eredményt kapunk. A legtöbb esetben a 10-20%-os egyezés már elfogadható egy megbízható végeredményhez (MANN et al., 2001; THIEDE et al., 2005).

2.3.3.4 Peptid szekvenálás

A peptidszekvencia meghatározásához a peptideket fragmentálni kell, melyhez másodlagos gerjesztés, ütköztetés szükséges. Ezt ESI, vagy MALDI tandem tömegspektrométereknél ütköztetési aktiválással lehet elérni. A peptid a gerincmenti kötéseknel fragmentálódik, melyet az 1. ábra mutat be.



1. ábra: Peptid fragmentáció nomenklaturája

Legtöbbször b és y ionok keletkeznek, melyek az amid kötés felöli fragmentációt jelölik az N és C terminális felöli töltésük megtartásával. A fragmentációs spektrumban a keletkező és egymást követő b és y ionok tömegkülönbségéből lehet a peptid szekvenciájára következtetni (BIEMANN, 1992). A fragmentáció során a csak b és y ionok keletkezésével nagyon egyértelmű és könnyen megfejthető lenne a peptid szekvenciája. A valóság azonban mást mutat, hiszen nem minden iont lehet a kis mennyiségben történő keletkezése miatt detektálni, továbbá a fragmensek további dupla fragmentációja is megtörténhet a gerinc mentén (internal fragment ion), vagy az oldalsó csoportoknál. Így gyakran előfordul, hogy csak a peptid egy részét sikerül értelmezni és nem az egészet. Az így kapott MS/MS-adatokat például SEQUEST vagy MASCOT szoftverekkel hasonlíthatjuk össze egyes fehérje és genom adatbázisokban található információkkal. Az MS/MS-adatokkal történő keresés megbízhatóbb eredményeket eredményez, mint a PMF, mivel a peptid szekvenciájából eredő strukturális adatokat is figyelembe veszi.

Minél több szekvencia információt tudunk kinyerni az adatokból, annál nagyobb a fehérje azonosítás megbízhatósága. Így a kétdimenziós elektroforézissel szeparált fehérjefoltból vagy komplex fehérje oldatból származó peptideket gyakran analizálják LC ESI MS/MS-sel, amely a peptidek hatékony elválasztása révén azonosításra is kiválóan alkalmazható (DEVREESE et al., 2001).

2.3.3.5 Proteomikai adatbázisok

Az 1960-as évek molekuláris biológiai kutatásai alapján az 1980-as évek végére automatizált nukleinsav (DNS és RNS) és fehérjeszekvenálási módszerek jöttek létre. Már a kezdetekkor Margaret Dayhoff úttörő fehérjekutatási munkássága során is nyilvános adatbázisokba gyűjtötték a fehérjeszekvenciákat (ELLIS és ATTWOOD, 2001). Később, a számítástechnika fejlődésével az összegzés helye is megváltozott: a strukturális és genomikai eredményeket, a legkülönbözőbb

(fehérjét, rRNS-t kódoló stb.) nukleinsav- és peptidszekvenálási projektekből érkező információkat az interneten, többnyire szabadon hozzáférhető adatbázisokban kezdték gyűjteni. Jelenleg az aminosav-szekvencia analízishez az alábbi adatbázisok elérhetőek: SWISS-PROT, TrEMBL, GenBank, TIGR, FASTA, BLAST, és WU-BLAST programok. A fehérjék PMF és szekvencia információk szerinti azonosításához pedig a PepSea, MOWSE, SEQUEST, PepFrag, FindMod, MASCOT, PeptIdent, Protein Prospector, és ProFound. Többnyire bármelyik eszköz és program megtalálható az ExPASy szerveren (JÓRI, 2004).

Növényi vonatkozásban eddig két élőlény teljes genetikai állományát sikerült megszekvenálni, a legkisebb genommal rendelkező lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) és az egyszikű rizs (*Oryza sativa*) genomját. Alkalmasint azonban az egyedi expresszáldó génszakaszok (EST) megszekvenálása is elegendő egyes fehérjék azonosításához, hiszen az EST-k a genom átíródnak szekvenciái. Az EST-k gyakorlatilag cDNS részleteknek feleltethetőek meg és a GenBank honlapján tekinthetjük meg őket a rendelkezésre álló fajok nevével (JÓRI, 2004). 2004-es és 2008-as állapotok szerint a GenBankban a 2. táblázatban felsorolt egyszikűekre vonatkozóan az alábbi számban voltak már megszekvenált egyedi expresszáldó génszakaszok.

2. táblázat: Néhány egyszikűre vonatkozó EST-k száma 2004-es és 2008-as adatok szemléltetésével ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/)).

Faj latin neve	EST-k száma 2004. februárban (db)	EST-k száma 2004. decemberben (db)	EST-k száma 2008. július (db)
<i>Hordeum vulgare</i> + subsp. <i>vulgare</i>	367800	377074	478.734
<i>Triticum aestivum</i>	549.926	587.650	1.051.768
<i>Zea mays</i>	391.145	417.056	1.464.448

Az árpa genom abiotikus stresszhatásokra adott válaszában tanulmányozásában már számos tanulmány született, melyek között TOMMASINI és munkatársai (2008) az alacsony hőmérséklet és fagy, valamint a szárazság hatásának kutatása közben 4153 gén expressziójának változását figyelték meg, melyek nagy része (82,4%) az *Arabidopsis thaliana* génjeivel mutatott hasonlóságot. A detektált gének közül 44% csak a szárazság, míg 3,8% csak a fagy hatására mutatott expressziós változást. A sorozatos kísérletekkel az árpa abiotikus stresszekre vonatkozó genetikai adatbázisa folyamatosan bővül, további vizsgálatokhoz referenciaként szolgál.

Az egyszíkűekre vontakozó EST-szekvenciák mellett az árpafehérjék azonosítását már számos *Hordeum vulgare* eredtű PMF is lehetővé teszi és segíti, melyek 2005 novemberi adatok alapján 450 kétdimenziós gélelektroforézissel elválasztott fehérje azonosítását tették lehetővé az érett, valamint a csírázó árpa szemtermésből és annak különböző alkotóiból a pH 4-11 régióban (ØSTERGAARD et al., 2002; FINNIE és SVENSSON, 2003; BAK-JENSEN, 2004; ØSTERGAARD et al., 2004). Mindez nagyon jó alapot adott az árpa szemtermés érése és a csírázása alatti fehérjeszintézisben bekövetkező változások nyomon követésére és ezen felül különböző fiziológiai összefüggések megállapítására (FINNIE et al., 2006).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során proteomikai módszerek alkalmazásával célul tűztem ki:

1. Három különböző árpafajta ('Jubilant', 'Bivoy', 'Mandolina') levélcsírájából származó karbamid-oldódó kétdimenziós fehérjemintázatok összehasonlítását és vizsgálatát, illetve annak kutatását, hogy a környezeti stresszhatásokra érzékeny ('Jubilant') és ugyanezen stresszhatásokra rezisztens ('Mandolina') árpafajták levélcsírájának kétdimenziós fehérjemintázata hogyan változik rövid ideig tartó nagy hőhatás következtében.
2. A 'Jubilant' tavaszi árpafajta karbamid-oldható fehérje-összetétel – eltérő termesztési körülmény hatására bekövetkező - változásának nyomon követését.
3. Annak proteomikai vizsgálatát, hogy a különböző koncentrációjú (200 μ M és 1 mM CdCl_2) kadmiumkezelések miként hatnak a 'Jubilant' árpafajta levélcsírájából kivont karbamid-oldódó fehérjékre..
4. Két különböző évjárat hatásának ellenőrzését három különböző árpafajta ('Jubilant', 'Bivoy', 'Mandolina') szemterméséből származó víz-só oldható fehérjék kétdimenziós mintázatára.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 A vizsgált minták

Felhasznált kétsoros tavaszi *Hordeum vulgare* sörárpafajták a Szegedi Gabonatermesztési Közhasznú Társaság Intézet táplánszentkereszti Növénynevelési Kutató Állomásáról származtak.

'Jubilant': Az 1990-es évek második felében a legnagyobb területen termesztett szlovák sörárpa. Magyarországon 1993-ban kapott állami elismerést. Termőképesége jó, bár a környezeti anomáliákra érzékenyen reagál. Söripari minősége kiváló. Magyarországon a legnagyobb vetésterületű sörárpafajta. Nemesítési eljárása: SK 1952 X 'Dera'.

'Bivoy': A legtermőképesebb, kiváló alkalmazkodóképességű német sörárpafajta. Szárazságtűrő. Magyarországon 2002-ben kapott állami elismerést. Nemesítési eljárása: BIE 27385 X 1.55557.

'Mandolina': Kiváló termőképességű, szárazságtűrő, alacsony fehérjetartalmú holland sörárpafajta. Magyarországon 1998-ban kapott állami elismerést. Az országos szortiment legalkalmazkodóképesebb tavaszi árpa. Nemesítési eljárása: 'Apex' X CA 46925.

4.2 Vegyszerek

A fehérjék izolálásához és az elektroforézishez használt vegyszerek

Az acetone, az ammónium-peroxi-diszulfát (analitikai tisztaságú), a Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250), az ecetsav (96 %-os, analitikai tisztaságú), az orto-foszforsav (85 %-os, analitikai tisztaságú), a tetrametiletilén-diamin (TEMED, analitikai tisztaságú) és a szaharóz a Reanal cég terméke volt (Budapest, Magyarország).

A 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilammonio]-propán-szulfát (CHAPS), a ditiotreitól (DTT), a karbamid, a β -mercaptoetanol, a nátrium-klorid, a trisz-(hidroximetil)-amino-metán (analitikai tisztaságú) a Merck cég terméke volt (Whitehouse Station, NJ, USA).

A fenilmetilszulfonil fluorid (PMSF) szerin és ciszteínproteáz inhibitor, a nátrium-dodecilszulfát (SDS, ultra tiszta >99%) a Sigma cég terméke volt (St. Louis, MO, USA).

A triklór-ecetsav (TCA, analitikai tisztaságú) Carlo Erba cég terméke volt (Rodano, Olaszország).

A tripszin Promega (Mannheim, Németország) gyártmányú volt.

4.3 A levélsíra proteomikai vizsgálata

4.3.1 A 'Jubilant', 'Mandolina' és 'Bivoy' árpafajták csíráztatása

A magok sterilizálásához 3%-os hidrogén peroxidot használtunk. Ebben álltak a magok 30 percen keresztül gyakori kevergetés mellett. Ezek után két órán át mostuk a magokat desztillált vízzel. A csíráztatást Petri-csészében végeztük (25 mag/csésze). Ebbe raktuk a 4 réteg papírvattát és egy réteg szűrőpapírt, majd erre helyeztük rá a magokat. A magok fölé ismét szűrőpapír került. A csíráztatás 24°C-on 5 napon át sötétben zajlott egy fitotrónban gyakori öntözés mellett.

A hőstressz vizsgálata céljából a 'Jubilant' és 'Mandolina' fajtákból származó összesen nyolcszor 25 árpa szemtermést 5 napon át csíráztattuk, majd öt nap elteltével mindkét fajta levélsírájának a felét két órahosszára 40°C-os termosztátba raktuk. Ezt követően a fehérje extrakciót azonnal elkezdtük az összes mintán.

4.3.2 A levélsíra fehérjéinek extrakciója

A csíráztatást követően a mintákat folyékony nitrogénnel fagyasztottuk és dörzsmozsárban törtük szét, majd ezek után homogenizáltuk a lipidek és egyéb szennyeződések eltávolítása céljából 10% TCA, 0,07% β -mercaptoetanol és aceton tartalmú oldatban. Ebben álltak a minták 1 órán keresztül -20°C-on, majd ezt követően 10 percig centrifugáltuk 16.000 xg-n 4°C-on. A felülúszót eltávolítottuk és a pelletet kétszer mostuk 0,07% β -mercaptoetanolt tartalmazó acetonban 2x1 órán át -20°C-on. A pelletet 1 éjszakás vákuumszáritást követően egy 8 M karbamidot, 40 mM Tris-base (pH 8,8), 4% CHAPS-ot és 1 mM PMSF-et tartalmazó extrakciós pufferben (25 μ l extrakciós puffer/1 mg szárazanyag) 30 percen át 37°C-on ráztuk. Az extrakciót követően a mintákat 10 percen át centrifugáltuk 16.000 xg-n 4°C-on.

4.3.3 Fehérjetartalom meghatározása

A vizsgált minták oldható fehérje-tartalmát BRADFORD (1976) leírása szerint határoztuk meg (Bradford Kit Assay Bio-Rad, Hercules, Ca, USA), ami egy egyszerű, festékkötődésen alapuló, fehérjetartalom mérésére szolgáló eljárás. Festéke a Coomassie Brilliant Blue G-250 festék, melynek savas oldatának abszorbancia maximuma fehérje jelenlétében (mennyiségtől függően) 465 nm-ről 595 nm-re változik. Kvarcküvetében JASCO 7850 spektrofotométerrel a fehérjéhez kötődő reagens 595 nm-en mért fényelnyelését mértük meg, és ismert fehérjetartalmú

BSA oldatot használva kalibrációs célra, határoztuk meg a mintában lévő oldható fehérjék koncentrációját $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ egységben. A festék a 3-5 kDa-nál nagyobb molekulatömegű fehérjéket detektálja. A fehérjetartalom meghatározását követően a mintákat kisebb egységekre bontva -80°C -on tároltuk felhasználásig.

4.3.4 Árpa levélsírájából kivont fehérjék kétdimenziós gélelektroforézissel történő elválasztása

Az első dimenzióban a levélsírájából származó fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján választottuk el immobilizált pH 3-10 gradienst tartalmazó gélsíkokon (Bio-Rad). A mintákat rehidratáló pufferben oldottuk (8 M karbamid, 0,05% CHAPS, 25 mM DTT), majd 550 μg fehérjét vittünk fel a 18 cm-es gélsíkokra, passzív rehidratálási protokollt követve (min.hét óra), majd Multiphor II system (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) készüléken a gyártó által előírt standard program szerint fókuszáltuk 18°C -on. Az izoelektromos fókuszálást követően a gélsíkokat equilibráltuk 6 M karbamidot, 2% SDS-t és 30% glicerint tartalmazó Trisz-HCl pufferben (pH=8,8) első lépésben 1% DTT jelenlétében 10 percig, majd 2,5% iodoacetamid jelenlétében szintén 10 percig.

Az equilibrálást követően a második dimenziós elválasztás során a fehérjéket PROTEAN Plus multi-casting chamber (Bio-Rad) gélöntővel öntött SDS-poliakrilamid géleken (12,5%T és 2,6%C összetételű főgélben HJERTEN-i (1962) betűjelölést használva) LAEMMLI (1970) által leírt gél és puffer rendszerben Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad) készülékben választottuk el molekulatömegük alapján, 15 percig 20mA/gél, majd 200V feszültség konstans beállításával. A géleket körülbelül 10 órán át futtattuk 8°C -os hűtött közegben, egészen addig, amíg a brómfenol jelzőfesték el nem érte a gélek alját.

Ezt követően a géleket Coomassie Brilliant Blue G-250 festékkel festettük ANDERSON és munkatársai (1989) kolloid festési protokollja alapján 24-72 órán át, majd a nem kötődő festék mosóoldattal történő eltávolítását követően a géleket 12-bit GS-710 kalibrált denzitométer (Bio-Rad) segítségével fényképeztük és PDQuest 7.1 szoftverrel (Bio-Rad) értékeltük ki. A szoftver segítségével automatikus spot detektálást végeztünk, melyet manuálisan korrigáltunk a különböző gélek fehérjefoltjai közötti összefüggés növelése érdekében. Az összepárosított fehérje foltok optikai denzitásának relatív mennyiségét kétmintás t-próba segítségével értékeltük ki és azon fehérjefoltokat vizsgáltuk tovább, melyek $p < 0,05$ valószínűségi szinten tértek el mennyiségileg egymástól.

4.3.5 Tömegspektrometriás vizsgálat

In situ emésztés

A gélből kivágott fehérjefoltokból a Coomassie festék eltávolítását követően a fehérje emésztését ROSENFELD és munkatársai (1992) protokollja alapján egy kis módosítással végeztük. A fehérjefoltot kétszer átmostuk 150 µl 200 mM ammónium-bikarbonát/50% acetonitril vizes oldatával 20 percig 30°C-on, majd eltávolítottuk a felülúszót és hagytuk a mintát szobahőmérsékleten száradni 10 percig. A fehérjék enzimés hidrolíziséhez tripszint használtunk. A mintákhoz 0,02 µg/µl tripszint tartalmazó 8 µl puffert (50 mM ammónium-bikarbonát, pH 7,8) adtunk, elősegítve az enzim gélbe jutását, a mintákat jégen tároltuk 45 percig. A tripszines emésztést 37°C-on végeztük egy éjszakán át további 20 µl 50 mM ammónium-bikarbonát hozzáadását követően. Másnap a gél felülúszóját Eppendorf csőbe pipettáztuk és a gélben lévő peptideket további 60% acetonitril/1% hangyasav oldat hozzáadásával extraháltuk (30°C-on, 5 percig), centrifugáltuk (13.200 RPM, néhány másodpercig) és az összes kinyert peptidet szárítottuk, majd 12 µl 0,1%-os hangyasavban oldottuk fel.

Fehérjeazonosítás tömegspektrometria segítségével

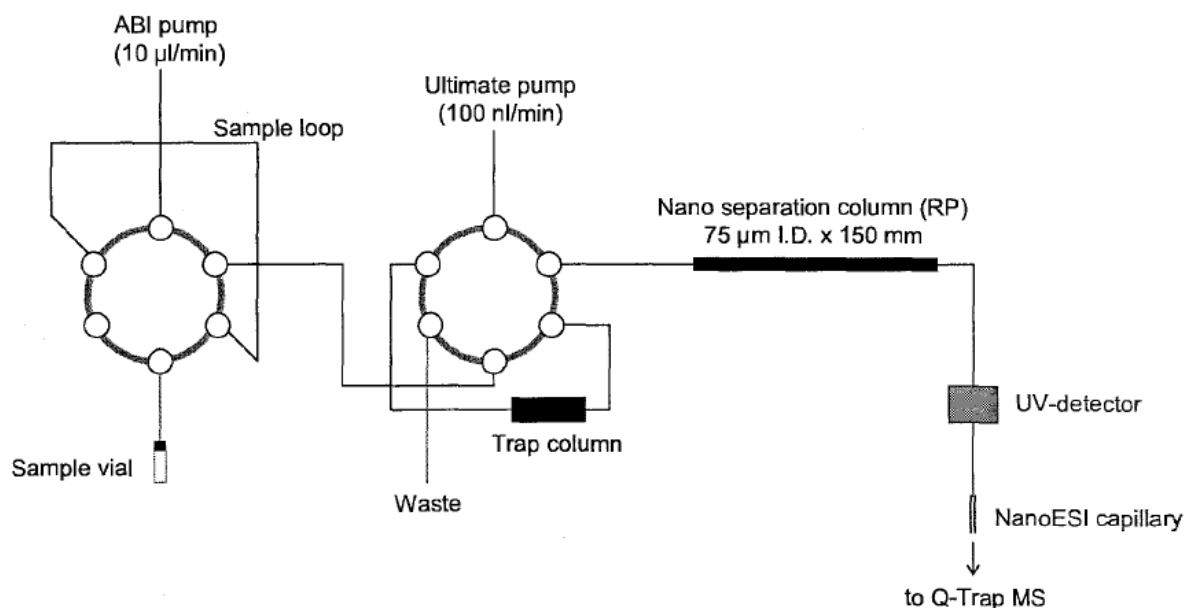
A fehérjék azonosítása a Ghenti Egyetem Fehérje Biokémiai és Fehérje Mérnökségi Laboratóriumában történt.

Az árpa genomszekvenciája még nem feltárt, de az eddig árpával kapcsolatban rendelkezésre álló EST-adatbázis információit (www.ncbi.nlm.nih.gov) letöltöttük és formatáltuk, hogy a MASCOT-adatbázis-kezelő program rendelkezésére álljanak az adatok. Amennyiben a megszekvenált peptidfragmensek alapján kreált EST-szekvencia ráillett az adatbázisban megtalálható EST-szekvenciára, akkor a BLAST-keresőprogrammal a továbbiakban jellemeztük.

A tripszines peptid emésztményt MALDI TOF/TOF tömegspektrométeren (Applied Biosystems, Framingham, CA, USA) mértük le. Első lépésben MS-módban működtettük a rendszert, ahol a képződött ionok 20 kV feszültség mellett gyorsultak fel és szeparálódtak. MS/MS-módban a szülői ion egy gáz cellába került, ahol a peptid fragmentálódott CID segítségével. Az így megformált fragmensek 15 kV feszültség alkalmazása mellett gyorsultak fel és az m/z-értékeket a második TOF csőben határozhattuk meg. Az ionforrásban 8 kV feszültséget alkalmaztunk, a gázcellában pedig 7 kV feszültség uralkodott 1×10^{-6} Torr levegőnyomás mellett.

A MALDI TOF MS és MS/MS vizsgálathoz a triptikus peptid emésztményt 1:1 arányban kristályosítottuk a mátrix oldatunkkal, mely 100 mM CHCA (α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav) volt 50% (v/v) acetonitrilt és 0,1% TFA-t tartalmazó vizes oldatban. A keveréket mintafelvívő lemezen adagoltuk be a műszerbe. A tömegspektrométert a mérés előtt a gyártó cég által előírt módon és meghatározott külső standard peptid keverékkel kalibráltunk. A minták mérése során abban az esetben, amikor a PMF nem volt eléggé meggyőző, néhány peptidet tovább vizsgáltunk MS/MS-módban is. A kapott szekvencia információk alapján a fehérjéket a helyi MASCOT szerver fehérje azonosító programjával azonosítottuk. Amennyiben az azonosítás nem adott megbízható eredményt a peptid keveréket nano-HPLC-vel szeparáltuk DEVREESE és munkatársai (2002) kísérleti beállításai alapján és ezt követően on-line ESI-Q-TRAP tömegspektrométerrel (Applied Biosystems) detektáltuk. A peptidek elválasztása egy nano-oszlopon történt (PEPMAP, Ø75 μ m, 15 mm), melyre a peptid keverék egy előkoncentrált követően került (mikro elő- kolonna (Ø 800 μ m, 2 mm)). Az oszlopról a peptidek eluálását lineáris gradienssel végeztük, az 5% acetonitril/0,1% hangyasav kiindulási koncentrációt 50 perc alatt 80% acetonitril/0,1% hangyasavra növelve, 100 nl/perc áramlási sebesség mellett. Az oszlopról eluált peptidek egy nanoelektrospray tűn keresztül jutottak a Q-TRAP tömegspektrométerbe, melyben egy automatizált MS-ről MS/MS működésbe átkapcsoló protokollt használtunk. Első lépésben a tömegspektrométer MS-szken módban működött (m/z 400-1500), melyet a két legintenzívebb ion további nagyobb intenzitású vizsgálata követett. Az utolsó szkennelés az ionok töltési állapotára is engedett következtetni, mely ha kétszeres vagy háromszoros töltöttségi állapotra utalt, akkor MS/MS vizsgálatra került sor.

A kísérletben használt nanoflow HPLC-rendszer vázlatos rajzát a 2. ábra mutatja be. Itt azt láthatjuk, hogy a minta első lépésben egy trapping (gyűjtő) oszlopra kerül sómentesítés és előkoncentrált céljából, majd innen mosás útján egy analitikai nano-HPLC-oszlopra (75 μ m I.D.) 100 nl/perc áramlási sebességgel. Innen a peptidek közvetlenül a Q-Trap tömegspektrométerbe jutnak, annak a szilika kapillárisán át on-line detektálást téve lehetővé.



2. ábra: Az Ultimate nano-HPLC-rendszer (LC Packings, Amsterdam, Netherlands) és egy Q-Trap tömegspektrométer összekapcsolásának vázlata (DEVREESE et al., 2002).

4.4 Árpa szemtermés proteomikai vizsgálata

4.4.1 Az árpa szemtermés szemcseméret alapján történő osztályozása

A 'Jubilant', 'Bivoy' és 'Mandolina' árpafajtákból származó magokat szemcseméret alapján osztályoztuk 2,2 mm, 2,5 mm, 2,8 mm átmérőjű szitasoron (Pfeuffer, Mess und Prüfgerate). A 2,5 mm-nél nagyobb gabonaszemeket darálón (Hagberg-Perten) őröltük meg és a továbbiakban az őrleménynek az 1,3 mm-es perforációs méretű szitán áteső frakcióját vizsgáltuk.

4.4.2 Évjáratok hatásának ellenőrzése a 'Jubilant', 'Bivoy' és 'Mandolina' fajtákban

4.4.2.1 Víz-só oldható fehérjék extrakciója

Egy súlyrész törethez 5 térfogatnyi 0,1 M NaCl oldatot adtunk és 1,5 órán át 5°C-on 200 rpm fordulaton rázógépen rázatva extraháltuk. A kapott szuszpenziót 12.000 xg-n, 10 percig, 22 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót alegységekre szedve -70°C-on tároltuk.

4.4.2.2 Fehérjetartalom meghatározása

A vizsgált minták oldható fehérje-tartalmát BRADFORD (1976) leírása szerint határoztuk meg a 4.3.3. pontban ismertetett módon.

4.4.2.3 Az árpa szemtermésből kivont fehérjék kétdimenziós gélelektroforézissel történő elválasztása

Az elsődimenzióban a szemtermés töretből kivont víz-só oldható fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján szeparáltuk immobilizált pH 3-10 gradienst tartalmazó gélcsíkokon (Bio-Rad). A mintákat rehidratáló pufferben oldottuk (8 M karbamid, 0,05% CHAPS, 25 mM DTT), majd 60 µg fehérjét vittünk fel 7 cm-es gélcsíkokra, passzív rehidratálási protokollt követve (min. 7 óra), majd PROTEAN IEF cell (Bio-Rad) készüléken a gyártó által előírt standard program szerint fókuszáltuk. Az izoelektromos fókuszálást követően a gélcsíkokat equilibráltuk 6 M karbamidot, 2% SDS-t és 30% glicerint tartalmazó Trisz-HCl pufferben (pH=8,8) első lépésben 1% DTT jelenlétében 10 percig, majd 2,5% iodoacetamid jelenlétében szintén 10 percig.

Az equilibrálást követően a második dimenziós elválasztás során a fehérjéket saját kezűleg öntött SDS-poliakrilamid 10-15%-os gradiens géleken SHI és JACKOWSKI (1998) által leírtak alapján (10%T 2,6%C; 15%T 2,6%C) Mini Protean II system (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA) készülékben szeparáltuk molekulatömegük alapján LAEMMLI (1970) által megadott puffer és gélrendszerben 200V feszültség konstans beállításával. A géleket körülbelül 1 órán át futtattuk, egészen addig, amíg a brómfenol jelzőfesték el nem érte a a gélek alját. Ezt követően a 4.3.5. pontban leírt módon festettük és értékeltük a géleket.

4.4.3 Nehezített termesztési körülmények hatásának vizsgálata

A vizsgált tavaszi 'Jubilant' árpafajta kontroll mintáit csapadékelátás szempontjából optimális talaj-előkészítési körülmények között termesztették facélia előveteményen és őszi szántást is kapott a tétel. A másik mintát egy speciális talaj-előkészítés eredményeként nehezített körülmények között, pillangós előveteményen termesztették, mely őszi szántásban nem részesült. Ennek következtében a vizet nem őrizte meg és szárazságstressz érte.

4.4.3.1 Árpafehérjék extrakciója

A kioldható összes fehérje izolálását lízis pufferrel végeztük. Egy súlyrész törethez 10 térfogatnyi puffert adtunk (7 M karbamid, 2 M tiokarbamid, 4% CHAPS, 200 mM PMSF, 14 mM DTT) és 1 órán át 37°C-os rázógépen rázatva extraháltuk. A kapott szuszpenziót 6.000 RPM-en, 15 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót alegységekre bontva -70°C-on tároltuk.

4.4.3.2 Fehérjetartalom meghatározása

A vizsgált minták oldható fehérjetartalmát BRADFORD (1976) leírása szerint határoztuk meg a 4.3.3. pontban ismertetett módon.

4.4.3.3 Az árpa szemtermésből kivont fehérjék kétdimenziós gélelektroforézissel történő elválasztása

A fehérjék első dimenziós és második dimenziós elválasztását egyenként 350 µg mennyiségű fehérjével végeztük a 4.3.4. pontban leírt módon és a gélek kiértékelése is ebben a pontban leírtaknak megfelelően történt.

4.4.3.4 Tömegspektrometriás vizsgálat

In situ emésztés

Az *in situ* emésztés a 4.3.5. pontban leírtak alapján történt.

Fehérjeazonosítás tömegspektrometria segítségével

A fehérjék azonosítása a 4.3.5. pontban megadott módon történt.

4.5 Kadmium hatásának vizsgálata

4.5.1 'Jubilant' árpafajta csíráztatása és kadmiummal kezelése

A 'Jubilant' árpafajta hét napon át folyó csíráztatása és a növény folyamatos 200 µM és 1 mM CdCl₂ koncentrációkkal való kezelése is a Budapesti Corvinus Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszékén történt. Ezt követően a levélcsírárt levágtuk a fehérje kinyerése céljából.

4.5.2 'Jubilant' árpafajta levélcsírájából a fehérjék extrakciója

A levélcsírából a karbamid oldható fehérjék extrakciója a 4.3.2. pontban leírtak alapján történt.

4.5.3 Fehérjetartalom meghatározása

A vizsgált minták oldható fehérje-tartalmát BRADFORD (1976) leírása szerint határoztuk meg a 4.3.3. pontban ismertetett módon.

4.5.4 A levélcsíra karbamid-oldható fehérjéinek SDS-poliakrilamid gélen történő elválasztása

Az SDS poliakrilamid gélelektroforézishez elsőként az árpa levélcsírájából kinyert fehérjét redukáló mintapufferrel kevertük össze ROSENBERG (1996) kiadott protokollja szerint, mely 10% w/v szaharózt, 5% v/v β -mercaptoethanol-t, 2% w/v SDS, 0,0625M Tris-HCl (pH 6,8), 0,0004% brómfenolkéket tartalmazott. A mintát ezt követően a fehérjék teljes redukálása céljából 5 percen át forraltuk, majd a különböző mintákból azonos mennyiséget (4 μ l) vittünk fel a 0,75 mm vastagságú vertikális SDS poliakrilamid gél egyes mintafelvívő helyeire. A fehérjék elválasztását LAEMMLI (1970) protokollja alapján az alábbi összetételű gyűjtőgélben: 6% T: 3.3% C és főgélben: 10% T: 3.3% C végeztük a Mini Protean II system (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA) készülékben 200V konstans feszültség alkalmazása mellett egészen addig, amíg a brómfenolkék elérte a gél alját. Az elválasztás végeztével a gél 10%-os TCA-ban történő fixálást követően Coomassie Brilliant Blue G-250 festékkel festettük, majd az egyes fehérjesávok láthatóvá válását követően háttérmosást alkalmaztunk és a géleket Gel Doc 2000 gél dokumentációs rendszerrel (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA) fényképeztük és az ehhez tartozó Quantity One kiértékelő szoftverrel (Bio Rad, Hercules, Ca, USA) értékeltük ki.

A poliakrilamid gélen használt molekulásúly marker hat különböző molekulatömegű komponensből állt, melyet a 3. táblázat mutat be.

3. táblázat: A poliakrilamid gélen használt molekulasúly marker hat különböző molekulatömegű komponense.

Komponensek	µg/tároló edény	Molekulatömeg [Da]
Foszforiláz b	64	94,000
Borjú szérum albumin	83	67,000
Ovalbumin	147	43,000
szénsavanhidráz	83	30,000
Szója tripszin inhibitora	88	20,100
α- laktalbumin	121	14,400

4.5.5 Az árpa levélsírájából kivont fehérjék kétdimenziós gélelektroforézissel történő elválasztása

Az első dimenzióban a hajtásból származó fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján szeparáltuk immobilizált pH 3-10 gradienst tartalmazó gélcsíkokban (Bio-Rad). A mintákat rehidratáló pufferben oldottuk (8 M karbamid, 0,05% CHAPS, 25 mM DTT), majd 550 µg fehérjét vittünk fel 18 cm-es gélcsíkokra, passzív rehidratálási protokollt követve (min.7 óra). A fehérjéket a PROTEAN IEF cell (Bio-Rad) készüléken a gyártó által előírt standard program szerint fókuszáltuk. Az izoelektromos fókuszálást követően a gélcsíkokat equilibráltuk 6 M karbamidot, 2% SDS-t és 30% glicerint tartalmazó Trisz-HCl pufferben (pH=8,8) első lépésben 1% DTT jelenlétében 10 percig, majd 2,5% iodoacetamid jelenlétében szintén 10 percig.

Az equilibrálást követően a második dimenziós elválasztás során a fehérjéket saját kezűleg öntött SDS-poliakrilamid géleken (12,5%T és 2,6%C) PROTEAN II XL multi-cell (Bio-Rad) készülékben szeparáltuk molekulatömegük alapján, 15 percig 20mA/gél, majd 200V feszültség konstans beállításával. A géleket körülbelül 6 órán át futtattuk 10-15°C-os hűtött közegben, egészen addig, amíg a brómfenol jelzőfesték el nem érte a gélek alját. Ezt követően a 4.3.4. pontban leírt módon festettük és értékeltük a géleket.

4.5.6 Tömegspektrometriás vizsgálat

In situ emésztés

A gélből kivágott (manuálisan) mintákból első lépésben eltávolítottuk a Coomassie festéket, háromszor átmostuk 25 mM ammónium-bikarbonát/50% acetonitril oldattal (10 percig), majd eltávolítottuk a felülúszót. A fehérjéket az enzimes hidrolízis előtt redukáltuk (25 µl, 10 mM DTT/25 mM ammónium-bikarbonát, fél óra, 56°C), majd alkiláltuk (25 µl, 55 mM jódiacetamid/25 mM ammónium-bikarbonát, 30 perc, szobahőmérséklet). A mintákhoz 100 ng tripszint tartalmazó 20 µl puffert (50 mM ammónium-bikarbonát) adtunk, a hidrolízist 37°C-on (4 óra) végeztük. A tömegspektrometriás analízis előtt ZipTipC18 tisztítást végeztünk (Millipore, Bedford, MA, USA).

Fehérjeazonosítás tömegspektrométerrel

A fehérjék azonosítása a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Orvosi Vegytani Intézetében történt. A MALDI TOF MS vizsgálatot 2,5- dihidroxi-benzoészav (DHB) mátrix jelenlétében zajlott. A mérést Bruker Reflex III MALDI-TOF MS készüléken (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) pozitív ion reflektor módban végezték.

A fehérjéket peptidtömegek alapján az NCBI Mascot programjával (Matrix Science; <http://www.matrixscience.com/>) azonosították.

5. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

5.1 Hőstressz hatásának vizsgálata két különböző genotípusú árpa levélsírájának proteomjára

Az élő szervezeteknek együtt kell élniük a környezeti stressz hatásaival. A különböző stressz körülmények hatással vannak meghatározott jelátviteli és anyagcsere-útvonalak fehérjéire, melyek többek között a metabolizmusban, bioszintézisben, a katabolizmusban, a fehérje metabolizmusban, elektron transzportban játszanak szerepet. A stressz körülmények eredményezhetik stresszfehérjék (pl. HSP-k) szintézisét is, melyek expressziója is hozzájárul a növények különböző stressztényezőkkel és betegségekkel szembeni ellenálló képességének javításához. Az abiotikus stresszel szembeni tolerancia teljes megértésének azonban akadályt szab az egyes tulajdonságok több génhez is kapcsolódó megjelenése. Így a növény védekezési reakcióiban részt vevő gének felkutatása és ezen gének toleráns, stressztűrő fajták nemesítési céljára történő felhasználása a mai nemesítő programok célja.

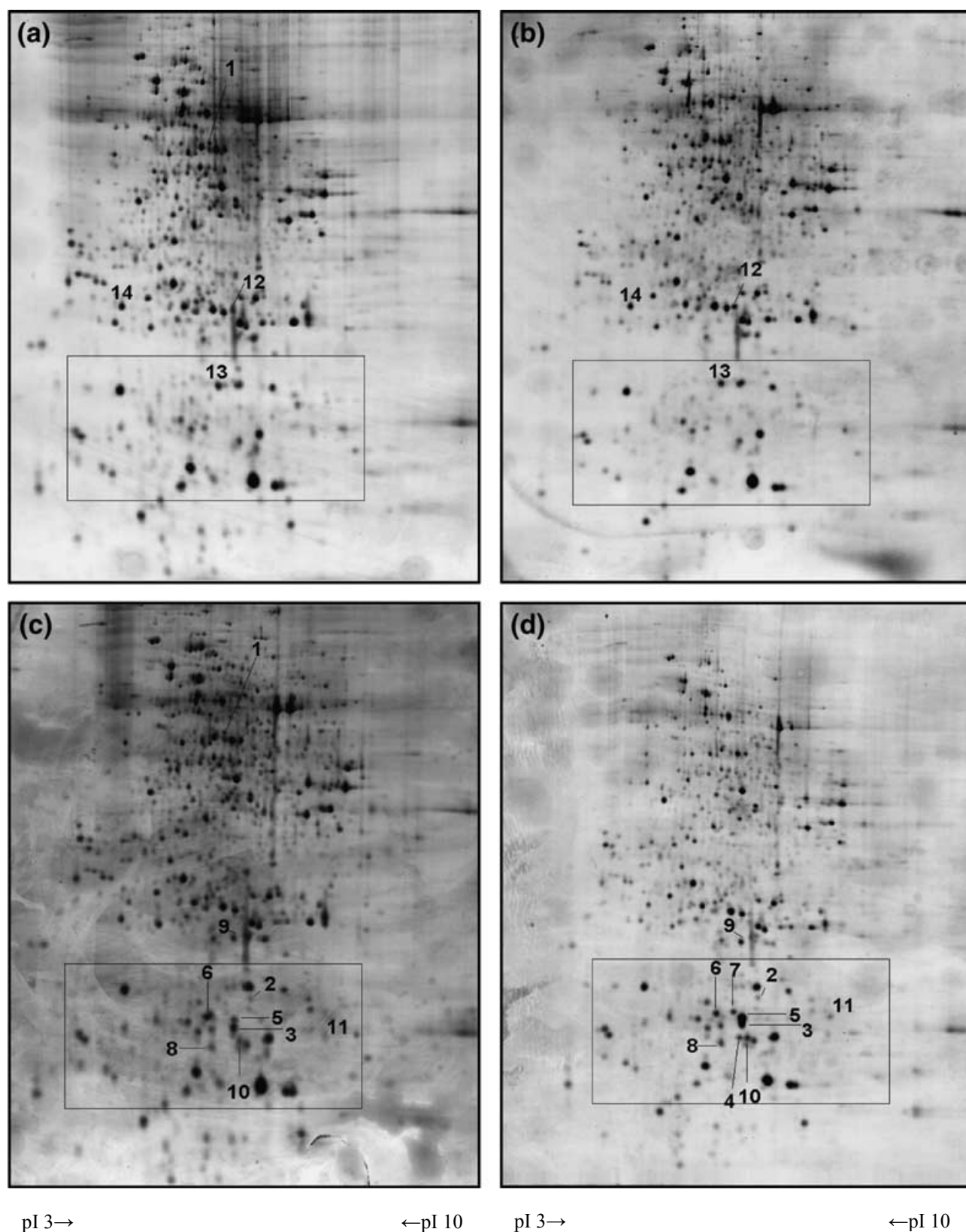
A jelen kísérletben három különböző árpafajta levélsírájából származó karbamid-oldódó kétdimenziós fehérjemintázatot hasonlítottunk össze, majd azt vizsgáltuk, hogy a környezeti stresszhatásokra érzékeny és ugyanezen stresszhatásokra rezisztens árpafajta hajtásának kétdimenziós fehérjemintázata hogyan változik rövid ideig tartó nagy hőmérsékleti stresszhatás következtében. Célunk az volt, hogy a két különböző, környezeti stresszhatásokkal szemben is eltérően viselkedő fajtában a fehérjék szintjén vizsgáljuk a hőhatás által kiváltott reakciót. A kísérletbe Magyarországon sörárpatermesztésben használt két soros tavaszi árpafajtákat ('Jubilant' és a 'Mandolina') vontuk be.

A fehérjeelválasztás kétdimenziós elektroforézissel történt, mely során a reprodukálható eredmények érdekében az összes minta esetében egy időben, azonos berendezésben és kontrollált hőmérsékleti viszonyok között valósult meg az izoelektromos fókuszálás, az SDS gélöntés, valamint a második dimenziós molekulatömeg szerinti elválasztás is.

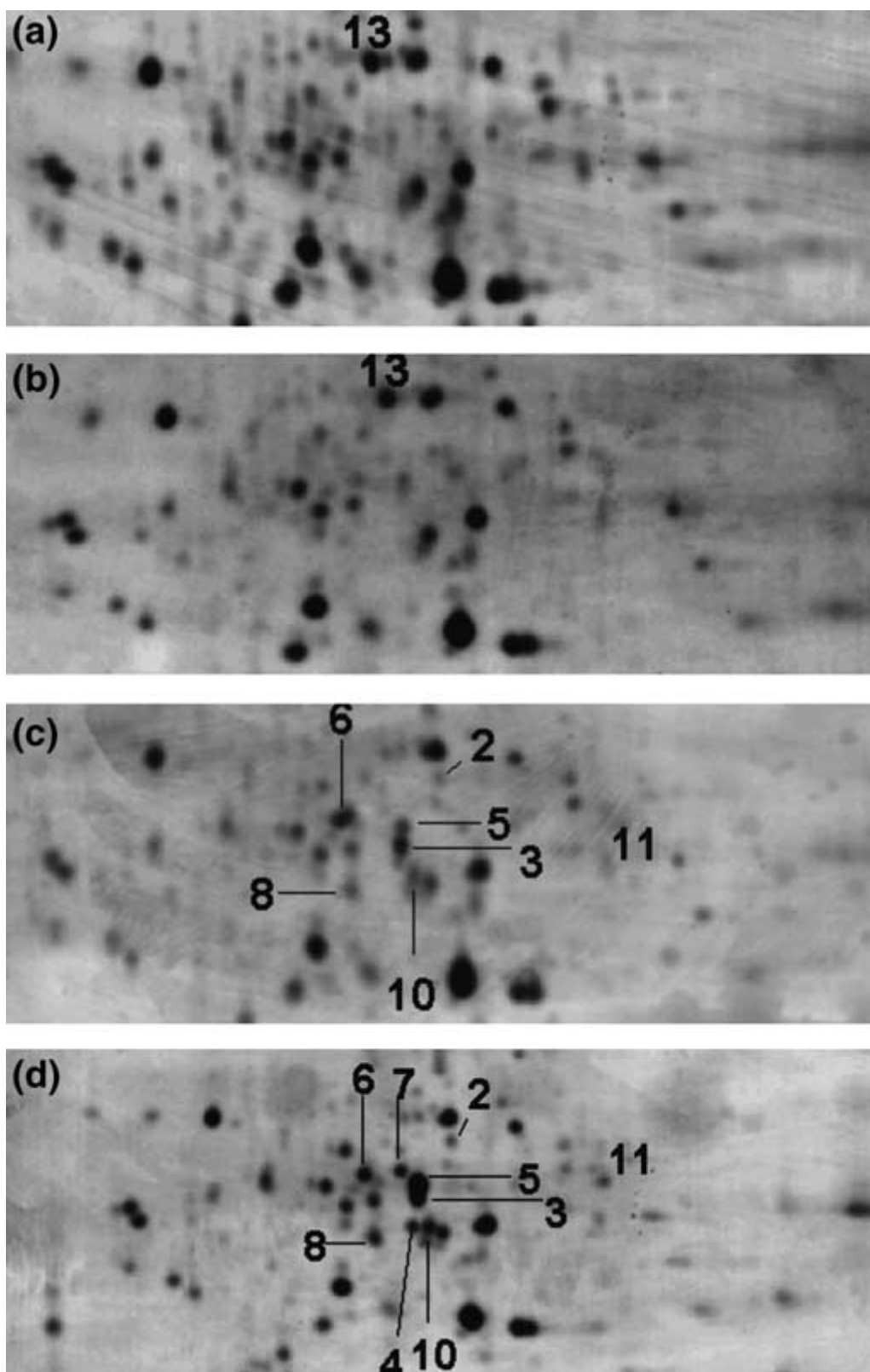
A kétdimenziós fehérjemintázatokon, melyek a 3. ábrán láthatóak, egyenként 400-500 fehérjefolt látszott CBB G-250 festékkel. Kiértékeléskor két-két csoportot képeztünk, egyrészt az abiotikus stresszekre érzékeny genotípus normál és hőstressznek kitett változatát, másrészt ismét két csoportban ugyanezen stresszhatásokkal szemben ellenálló fajta két hőmérsékleten tartott változatát vizsgáltuk. Az ismétlésekben a fehérjefoltok reprodukálhatósága nagyon magas volt, amely a szórási görbe (scatter plot) (>80%) és az átlagos variációs együttható ($CV < 35\%$) adataiban is tükröződött.

A kiértékelés első lépésében szoftver segítségével hasonítottuk össze a két különböző genotípusból származó fehérjefoltok – az egyes hőmérsékleti kezelések közötti – elhelyezkedését. Ennek alapján 24°C-on egy olyan fehérjefoltot találtunk a 'Mandolina' fajtában, mely nem volt detektálható a 'Jubilantban', 40°C-on pedig a 'Jubilant' expresszált két olyan egyedi fehérjét, amely pedig a 'Mandolinában' nem volt kimutatható, tehát a két fajta fehérjeexpressziós profilja ezen eredmények alapján nagyon kis eltérést mutatott.

A rövid ideig tartó hőmérsékleti stresszhatás által kiváltott fehérjeexpressziós változás tanulmányozását a kiértékelés során újabb csoportok képzésével folytattuk. Egy csoportba raktuk a 24°C és egy másik csoportba a 40°C-os hőstressznek kitett kétdimenziós mintázatokat. A két csoport 4-4 párhuzamost tartalmazott, melyek fehérjefoltjainak relatív integrált denzitás értékét hasonlítottuk össze, majd azokat a fehérjéket vizsgáltuk tovább tömegspektrometriás analízissel, melyek $p < 0,05$ statisztikai megbízhatóság mellett legalább kétszeres eltérést mutattak a denzitás értékükben. Az alkalmazott rövid időtartamú hőhatás mindkét árpafajta fehérjeexpressziós profilját megváltoztatta, főként a 15–30 kDa molekulatömeg és 4.0–8.5 pH-tartományban. A megváltozott vagy újonnan expresszált fehérjefoltokat a 3. ábrán számokkal jelöltük, foltok listáját pedig a 4. táblázatban foglaltuk össze.



3.ábra: Coomassie G-250 festéssel megfestett oldható fehérjefrakciók 2D-PAGE géljei (a) a 'Mandolina' 24°C-on; (b) a 'Jubilant' 24°C-on csíráztatott; (c) a 'Mandolina' 40°C-on és (d) a 'Jubilant' fajták 40°C-on stresszelt levélsírájából. A számozott vonalak jelölik a fajták között, valamint a hőstressz következtében eltérően expresszált fehérjéket.

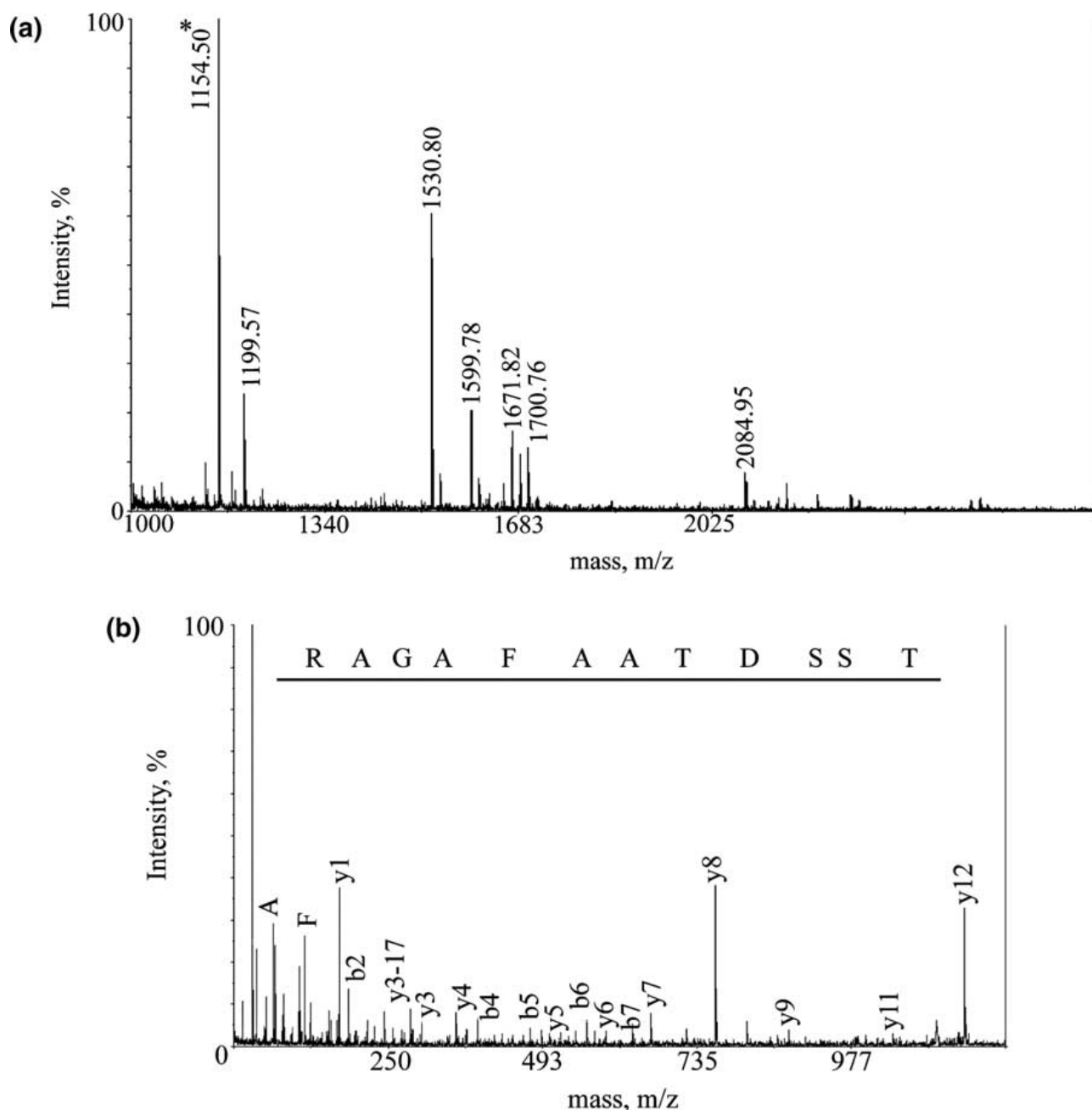


4. ábra: A 3. ábra kiemeléseinek részletezett képei: (a) a 'Mandolina' 24°C-on; (b) a 'Jubilant' 24°C-on csíráztatott; (c) a 'Mandolina' 40°C-on és (d) a 'Jubilant' fajták 40°C-on stresszelt levélcsírájából.

5.1.1 Tömegspektrometriás analízis

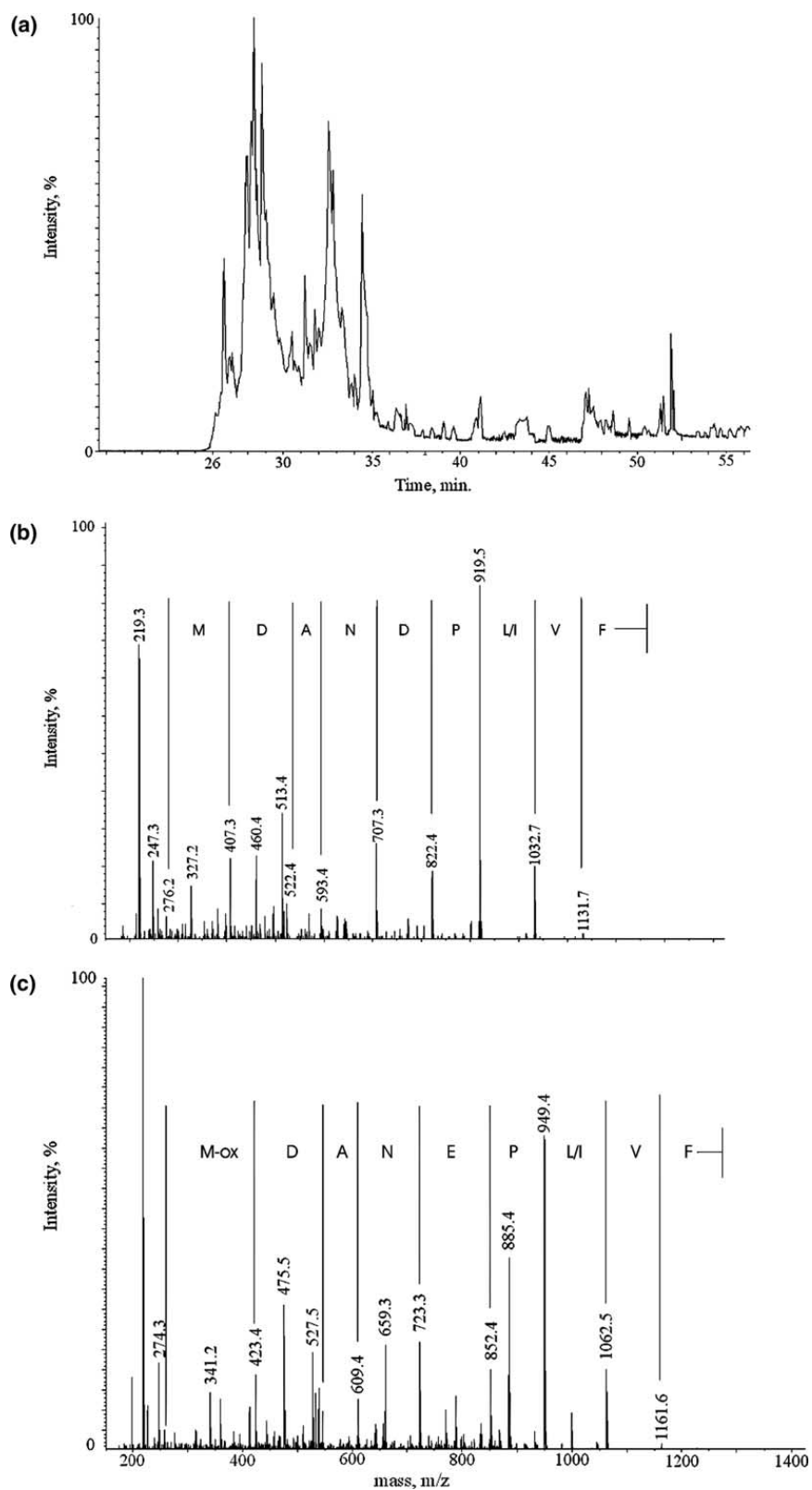
A proteomikában a tömegspektrometriás kiértékelés alapvető feltétele a megfelelő mennyiségű, az adott vizsgálandó szervezetre vonatkozó szekvenciainformáció. Ahogyan azt már az irodalmi áttekintésben is ismertettem, az árpával kapcsolatban még viszonylag kevés adat áll rendelkezésre, hiszen a genomszekvenciájának még csak töredéke ismert.

A vizsgálat során problémát okozott, hogy a peptidtömeg ujjlenyomat a legtöbb esetben nem adott elegendő információt az azonosításhoz. Ezért a szekvencia információ megszerzése céljából két tandem tömegspektrométert használtunk a peptidek szekvenálására: a MALDI TOF/TOF készüléket és a Q-TRAP LC-MS/MS rendszert. Mindkét műszer MS/MS mérő kapacitásának köszönhetően képes peptidekből aminosavszekvencia-információkat kinyerni. Első lépésben a peptid keveréket MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel próbáltuk meg azonosítani, mely gyors és érzékeny ionizációs tulajdonsága mellett kis manuális mintakezelést igénylő technika, valamint nagy előnye, hogy MS- és MS/MS-módban is használható a két analizátor közötti gáz cellának köszönhetően. Az 5/a. ábra mutatja be a 6. fehérjefoltból származó tripszines emésztmény MS-módban kapott tömegspektrumát, míg az 5/b. ábra egy MS/MS-spektrumot ábrázol.



5. ábra: (a) A 6. fehérjefolt PMF tömegspektruma látható, mely alapján a fehérje nem volt azonosítható. (b) Az (a) ábrán (*)-al jelölt peptidfragmens MS/MS-spektruma látható. Az így nyert aminosav-szekvencia alapján a fehérje egy rizsben talált sHSP fehérjével mutatott homológiát.

A mintában lévő sok szennyeződés miatt nem tudtunk egyértelműen azonosítani minden egyes fehérjét. Ebből kifolyólag második megközelítésként a peptid emésztményt egy ESI-Q-TRAP tömegspektrométerhez kapcsolt nano-HPLC-rendszeren vezettük keresztül, mely alapos mintatisztítást is eredményezett. A 6/a. ábrán a 8-as számú fehérjefolt LC-szeparációt követő teljes ionáramkromatogramját (TIC) mutatjuk be, míg a 6/b. és 6/c. ábrák egy fehérjefoltból származó 28,98 perces és 28,23 perces retenciós idővel rendelkező peptidek MS/MS-spektrumát demonstrálják.



6 ábra: (a) A 8-as számú fehérjét tartalmazó minta LC-szeparációt követő teljes ionáramkromatogramja.(TIC). (b) A 1277.66 Da tömegű peptid fragmentációs (MS/MS) spektrumát demonstrálja. (c) A 1307.6 Da tömegű peptid MS/MS-spektruma ugyanabból a mintából, mely két különböző fehérje izoform jelenlétére utal.

5.1.2 Tömegspektrometriával azonosított fehérjék

Az előző fejezetben megemlített, a 3. ábrán 1-es számmal jelölt fehérjefolt nagyobb mennyiségű expresszióját érzékeltük a 'Mandolina' fajtában, mint a 'Jubilantban'. A fehérjefolt optikai denzitása 24°C és 40°C-on is hasonló értéket mutatott. Az LC-MS/MS-rendszer révén ezen fehérje számos peptidjének szekvenálásával az S-adenozilmetionin szintetáz (SAM-S) enzim egyik izoformját azonosítottuk, ugyanis a kapott eredményünk nagy homológiát (98%) mutatott a búza (*Triticum aestivum*) SAM-S enzimével.

A sejten belül a SAM-S enzim rendkívül fontos szerepet játszik az L-metionin ATP segítségével történő S-adenozil-L-metioninná (SAM vagy AdoMet) alakításában, mely az élők anyagcseréjének egyik alapvető fontosságú vegyülete, a Met aktivált formája. A SAM az egész anyagcsere transzmetilációs folyamataiban a metil csoportot szolgáltatja, épp ezért metilcsoport-donorként is említik (BOERJAN et al., 1994). A metilezés mint legfontosabb anyagcsere-funkció mellett a SAM számos más reakcióban is részt vesz, például a poliaminok anyagcseréjében és az etilén bioszintézisben.

Az *Arabidopsis thaliana* genom szekvenálása során 4 darab SAM-S gént azonosítottak, melyek közül a SAM-S1 és SAM-S2 génterméke 97%-os azonosságot mutatott aminosav sorrendjük alapján (SHEN et al., 2002).

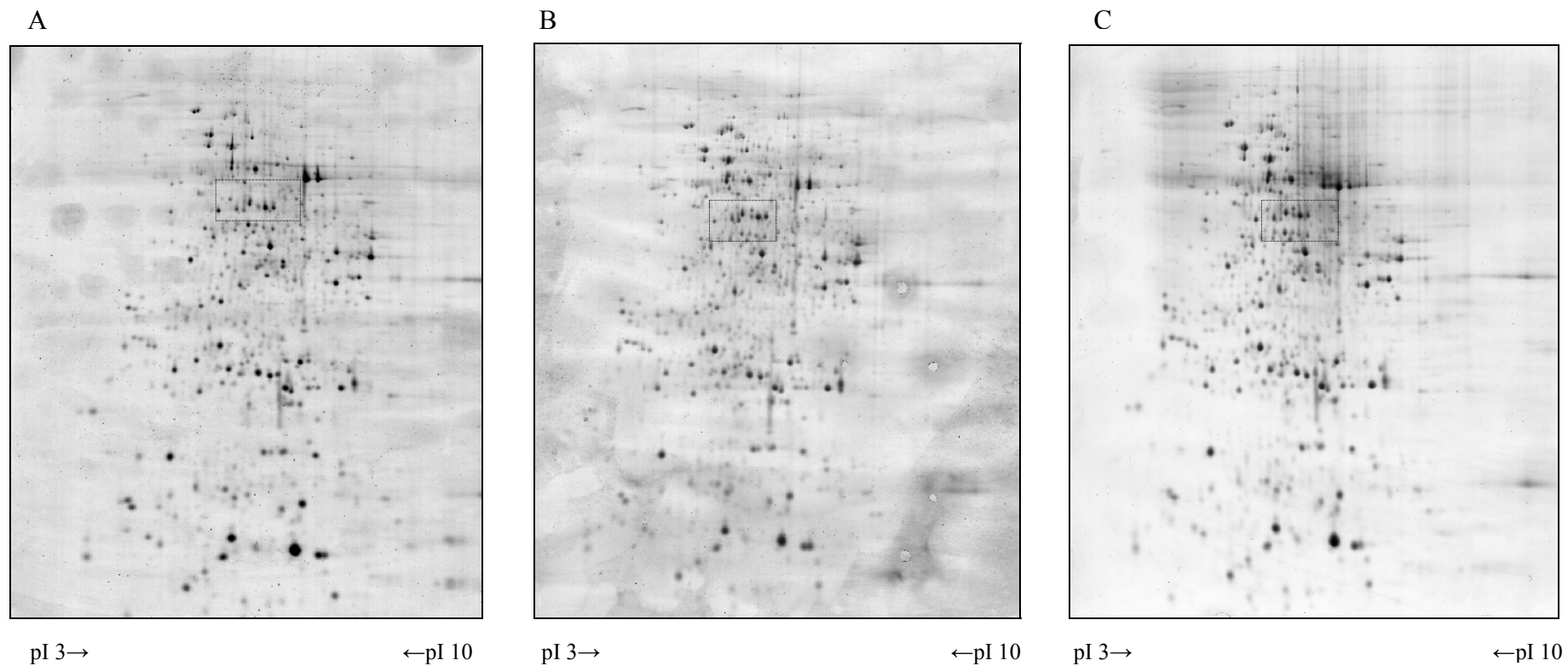
A SAM-S enzim az aszparaginsav aminosav család hat tagjának bioszintézisében szerepet játszó anyagcsereút egyik résztvevője, mely során néhány esszenciális aminosav is keletkezik: a metionin, a lizin, a treonin és az izoleucin (AZEVEDO és LEA, 2001). Az anyagcsereút enzimei a levelek kloroplasztjában vagy pedig a fotoszintézisre nem képes szervek közül a mag és gyökér plasztidjaiban vannak jelen (LEA és AZEVEDO, 2003). A SAM-S ciklus három fő enzimét (SAM-S-t, metionin-S-metiltranszferázt és S-adenozilhomocisztein hidrolázt) kódoló gének fokozott expressziója figyelhető meg az abiotikus stresszhatások következtében (HOUDE et al., 2006). Azonban stresszhatásokra nemcsak egyes fehérjék génexpressziója változhat meg, hanem ugyanazon funkciót ellátó fehérje izoformok is különbözőképpen expresszálódhatnak, melyek között a glutation-S-transzferázt, a SAM-S-t, a különböző dajkafehérje funkciót ellátó fehérjéket és az aszcorbát peroxidázt lehet megemlíteni. Erre a jelenségre számos magyarázat lehetséges: a promoter régió eltérő erőssége, szabályozása, az izoformok eltérő szöveti specificitása, valamint különböző stabilitása és módosulása (BOHNERT et al., 2001).

MAYNE és munkatársai (1996) kísérletükben szárazságstressz alatt a SAM-S enzim aktivitásának növekedését észlelték, mely a szárazságstresszt követően is megmaradt. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a SAM-S nagy valószínűséggel olyan reakciókban is részt vehet, melyek a hajtást a túlélés érdekében védik a hosszabb ideig tartó szárazságstressz káros

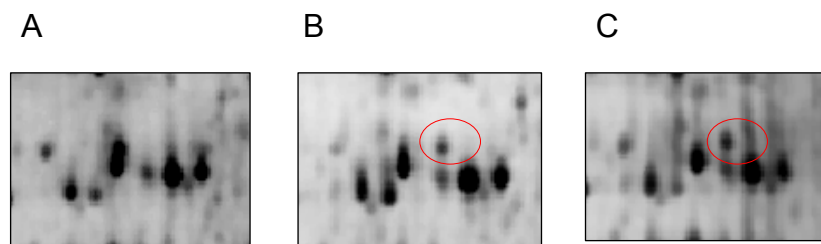
hatása ellen. Ezen kívül a SAM-S enzimatiskus aktivitásának növekedését sóstressz hatására is kimutatták a *Suaeda salsa* növényben (MA et al., 2003).

Munkánk során további kísérletek elvégzésére sarkallt bennünket, hogy kimutattuk a SAM-S enzim egyik izoformját a közismerten szárazságtűrő 'Mandolina' fajta 1. fehérjefoltjából, míg a környezeti anomáliákra érzékeny 'Jubilant' fajtában ezt az izoformot nem tudtuk detektálni. Így kibővítettük kísérletünket egy következő fajtával: a szintén szárazságtűrő 'Bivoy' tavaszi sörárpával.

A levélsírákból kinyert karbamid-oldódó fehérjék kétdimenziós fehérjemintázatait a 7. ábra mutatja be, melynek részletesebb kiemeléseit a 8. ábra demonstrálja. A géleképek kiértékelését követően bebizonyosodott, hogy a 'Bivoy' fajtában is a 'Mandolinához' hasonlóan detektálható a SAM-S enzim azon izoformja, mely a 'Jubilant' fajtában nem mutatható ki.



7. ábra: Coomassie G-250 festéssel megfestett oldható fehérjefrakciók 2D-PAGE géljei (A) 'Jubilant' 24°C-on; (B) a 'Bivoly' 24°C-on és (C) a 'Mandolina' 24°C-on csíráztatott levélsíráiból.



8. ábra: A 7. ábra kiemeléseinek részletezett képei.

5.1.3 Hőstressz hatására expressziós változást mutató fehérjék

A 4. ábra mutatja be azokat a fehérjéket, melyek a kísérletben hőstressz hatására megnövekedett expressziós változást mutattak. A fehérjék tömegspektrometriás azonosításukat követően megállapítottuk, hogy mind hősokkfehérjék és három csoportot alkotnak:

1. a búza 16,9 kDa sHSP fehérjéivel homológ fehérjék,
2. a búza 17,8 kDa sHSP fehérjéivel homológ fehérjék,
3. a rizs sHSP fehérjéivel homológ fehérjék.

A 4. ábra 3. fehérjefoltjából a búza 16,9 kDa-os HSP fehérjéjével több homológ árpafehérje peptidszekvenciáit is sikerült azonosítani. A megszekvenált peptidfragmensekkel az árpára rendelkezésre álló EST-adatbázisban keresést végeztünk, mely segítségével az alábbi, 9. ábrán felsorolt EST-szekvenciákban találtunk a peptidfragmenseinkkel lefedést mutató régiókat. Piros színnel a mintánkból származó azon megszekvenált triptikus peptideket jelöltük, melyek az adatbázis mindössze egy adott EST-szekvenciájának megfelelő régiójával mutattak teljes azonosságot (a különbségért felelős aminosavak illetve aminosav-hiány szürke háttérrel kiemelve), míg fekete vastag betűvel azokat emeltük ki, melyek nem voltak az adott EST-szekvenciákra egyedileg jellemzőek. Az összehasonlítás alapján a 3. fehérjefoltban legalább öt olyan izoform párhuzamos jelenléte feltételezhető, melyek 92-97%-ban azonosak a búza 16,9 kDa-os HSP fehérjéjével. Az izoformok csak néhány aminosavban tértek el egymástól, mely olyan kis különbséget eredményezett a fehérjék izoelektromos pontjában és molekulatömegében is, hogy az adott elválasztási körülmények között nem lehetett elkülöníteni őket.

```
gi21964213      MSIVRRSNVDFPFDADLWADPFDTFRSIVPAISGNSETAAAFANARMDWKETPEAHVFKAD 60
gi18212283     MSIVRRSNVDFPFDADLWADPFDTFRSIVPAISG-NSETAAAFANARVDWKETPEAHVFKAD 59
gi24238923     MSIVRRSNVDFPFDADLWADPFDTFRSIVPAISGNSETAAAFANARMDWKETPEAHVFKAD 60
gi18213982     MSIVRRSNVDFPFDADLWADPFDTFRSIVPAISGNSETAAAFANARMDWKETPEAHVFKAD 60
gi21195581     MSIVRRSNVDFPFDADLWADPFDTFRSIIPAISG-NSETAAAFANARMDWKETPEAHVFKAD 59
gi21940839     MSIVRRSNVDFPFDADLWADPFDTFRSIIPAISG-NSETATAFANARMDWKETPEAHVFKAD 59
***** .***.*****.***.*** *****.*****.*****.*****

gi21964213      LPGVKKEEVKVEVEDGNVLVVSGETRKEKEDKNDKWHRVERSSGKFVRRFRLPEDAKVEE 120
gi18212283     LPGVKKEEVKVEVEDGNVLVVSGETRKEKEDKNDKWHRVERSSGKFVRRFRLPEDAKVEE 119
gi24238923     LPGVKKEEVKVEVEDGNVLVVSGETRKEKEDKNDKWHRVERSSGKFVRRFRLPEDAKVEE 120
gi18213982     LPGVKKEEVKVEVEDGNVLVVSGETRKEKEDKNDKWHRMERSGKFVRRFRLPEDAKVEE 120
gi21195581     LPGVKKEEVKVEVEDGNVLVVSGETRKEKEDKNDKWHRVERSSGGRFVRRFRLPEDAKVEE 119
gi21940839     LPGVKKEEVKVEASS---AASAVRR-----RRTRMISGTWVSA 94
***** ..*.*
*****

gi21964213      VKAGLENGVLTVTVPKTEVKKPEVKAIEISG 151
gi18212283     VKAGLENGVLTVTVPKTEVKKPEVKAIEISG 150
gi24238923     VKAGLENGVLTVTVPKTEVKKPEVKAIEISG 151
gi18213982     VKAGLENGVLTVTVPKAEVKKPEVKAIEISG 151
gi21195581     VKAGLENGVLTVTVPKA----- 136
gi21940839     AAAGL----- 99
***
```

A 4. ábra 4. fehérjefoltja élesen elvált a 3.-tól, mely ugyancsak szintén a 16,9 kDa-os fehérje egyik izoformját tartalmazta. Ennek az izoformnak az az érdekessége, hogy jelenlétét csak a 'Jubilantban' sikerült detektálni, a 'Mandolinában' nem volt látható az adott izoform.

SKYLAS (2002) hőtoleráns búza magjából izolálta ugyanezen 16,9 kDa-os hősokkfehérje egyik izoformját, amelynek hősokk következtében nagyobb mennyiségű expresszióját figyelték meg. Ezért a cikk szerzői ezen fehérjét a hőtoleranciáért felelős egyik lehetséges markerfehérjeként azonosították.

A jelenlegi kísérletből az derül ki, hogy egy fehérje több hasonló izoformjának jelenléte a gabonafajták sokkal finomabb és részletesebb analizését igényeli a hőtoleranciáért felelős markerfehérjék azonosításához.

Az 5., 6. és 7. fehérjefoltok is azonosíthatóak voltak, és a rizsből származó alacsony molekulatömegű hősokkfehérjével mutattak homológiát több, mint 76 %-os azonossági szinten. Ezen izoformok kétdimenziós gélen nagyon szépen elkülönültek egymástól, melyet a 3. és 4. ábra is szemléltet. A 7-es számú hősokkfehérje csak a stresszérzékeny ‘Jubilant’ fajtában volt kimutatható a 4. fehérjéhez hasonlóan, míg a ‘Mandolinában’ ezen fehérjék expressziója nem volt detektálható.

A hősök hatására nagy mennyiségben szintetizálódó dajkafehérjének abban lehet szerepük, hogy megakadályozzák a magas hőmérséklet következtében kialakuló aggregálódást, valamint elősegítsék a lebomlást. A stresszhatásokra képződő HSP-k körülbelül 69%-ának pontos funkciója még nem ismert (BOHNERT et al., 2001).

A hőkezelés következtében mindkét fajtában megfigyeltük a három fehérje mennyiségének csökkenését. Ezek között szerepelt a 12-es számú fehérje, melyet a kettes fotokémiai rendszer (PSII) egy 23 kDa oxigénfelszabadító fehérjéjeként sikerült azonosítani 98%-os azonossági szinten. Ez a fehérje a PSII oxigénfelszabadító komplexének (OEC) egyik fehérjéje. Az OEC minimum öt fehérjéből épül fel, elsődleges feladata az, hogy vízmolekulákból molekuláris oxigént szabadítson fel.

A fotoszintetizáló élőlények a normál fiziológiai hőmérséklet feletti hőhatásnak kitéve gyakran visszafordíthatatlan fotoszintetikus károsodást szenvednek el. A PSII egyike a hőre legérzékenyebb fehérjekomplexeknek a fotoszintetikus rendszeren belül, mely a tilakoid membránfehérjék károsodásának tudható be (BERRY és BJÖRKMAN, 1980). PRECZEWSKI és munkatársai (2000) megfigyelései szerint a PSII fehérjekomplexet hőstressz alatt egy kloroplasztból származó Hsp24 fehérje védelmezi. Az általuk 'Hsp24 chipnek' elnevezett fehérje expressziója a megfigyelt fenotípusokban pozitív korrelációt mutatott a PSII komplex hővel szembeni ellenálló képességével.

Hőstressz hatására továbbá a 13. fehérjefolt is csökkenő mennyiségi változást mutatott. Ezt a fehérjét transzláció iniciáló faktor 5A (eIF-5A)-ként azonosítottuk, a sejten belül az első peptidkötés kialakításában segédkezik a fehérjeszintézis alatt. TAKEUCHI és munkatársai (2002) emberi hasnyálmirigy-tumorsejt vonalakat 45°C-os hőstressznek kitéve figyelték meg az eIF-5A fehérje aktív konformációjának szétesését, mely egy nagyon fontos lépése a tumorsejtek visszafordíthatatlan elpusztulásának. THOMPSON és munkatársai (2004) leírták, hogy az eIF-5A különböző izoformjai szerepét írták le a sejt proliferáció és a sejthalál regulációjához szükséges mRNS-ek transzlációjában. A csökkent eIF-5A szintézis az *Arabidopsis thaliana* növényben drámai hatással bírt a növény növekedésére és fejlődésére. Az eIF-5A aktív konformációjának kialakulásáért a DHS szintetáz enzim felelős, melynek szupressziója növekedett szárazságstressz-toleranciát idéz elő (WANG et al., 2003).

4. táblázat: A fajták között, valamint hőstressz hatására expressziós változást mutató fehérjék listája (SÜLE et al., 2004).

Fehérje - folt	Azonosítási szám ^{a)}	Lefedtség (%) ^{b)}	Fehérje ID	Organizmus	Peptid-tömeg	Szekvencia	Azonosság (%) ^{c)}	Megjegyzés	Módszer
1.	gi11895380 ABY85789	13,2	S-adenozil metionin szintetáz	<i>Triticum aestivum</i>	1469.73	TNMVMVFGEITTK	98		LC-MS/MS
					2042.98	QVTVEYHNDNGAMVPIR			
2.	gi18234603		Nem azonosított fehérje	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1410.88	ILIPTLSVLSLSR			LC-MS/MS
3.	gi18213982 ACD03605	42,4	16.9 kDa sHSP	<i>Triticum aestivum</i>	974.52	FRLPEDAK	96		LC-MS/MS
					1026.60	AEVKKPEVK			
					1396.79	AGLENGVLTVTVPK			
					1616.76	MDWKETPEAHVFK			
					1931.97	SIVPAISGGNSETAAAFANAR			
	gi21940839 ACD03605	19	16.9 kDa sHSP	<i>Triticum aestivum</i>	1918.98	SIIPAISGNSETATFANAR	92		LC-MS/MS
	gi24238923 ACD03605	6	16.9 kDa sHSP	<i>Triticum aestivum</i>	1056.62	TEVKKPEVK	97		LC-MS/MS

4. táblázat (folytatása): A fajták között, valamint hőstressz hatására expressziós változást mutató fehérjék listája (SÜLE et al., 2004).

Fehérje - folt	Azonosítási szám ^{a)}	Lefedtség (%) ^{b)}	Fehérje ID	Organizmus	Peptid-tömeg	Szekvencia	Azonosság (%) ^{c)}	Megjegyzés	Módszer
A rövid időtartamú hősokk következtében növekedett expressziót mutató fehérjék									
	gi21964213 ACD03605	13,2	16.9 kDa sHSP	<i>Triticum aestivum</i>	1961.98	SIVPAISGSNSETAAAFANAR	96		LC-MS/MS
	gi18212283 ACD03605	12,66	16.9 kDa sHSP	<i>Triticum aestivum</i>	1908.93	SIVPAFSGNSETAAAFANAR	94		LC-MS/MS
	gi21195581 ACD03605	13,97	16.9 kDa sHSP	<i>Triticum aestivum</i>	1888.96	SIIP AISGNSETAAAFANAR	95		LC-MS/MS
4.	gi21968553 ACD03605	41,3	16.9 kDa sHSP	<i>Triticum aestivum</i>	1979.97	SIFPAISGGNSETAAAFANAR	93		LC-MS/MS
					2225.04	SNVLDPFADLWADPFDTR			
					1824.04	AGLENGVLTVTVPKAEVK			
					1967.09	VDEVKAGLENGVLTVTVP K			
5.	gi13091926 AAP16884	13,6	Kis molekulatömegű HSP	<i>O. sativa</i>	1153.54	TSSDTAAFAGAR	76		MALDI TOF/TOF
					1598.81	IDWKETPEAHVFK			
6.	gi13091926 AAP16884	15	Kis molekulatömegű HSP	<i>O. sativa</i>	1153.54	TSSDTAAFAGAR	76		MALDI TOF/TOF
				<i>O. sativa</i>	1198.54	TDTWHRVER			

4. táblázat (folytatása): A fajták között, valamint hőstressz hatására expressziós változást mutató fehérjék listája (SÜLE et al., 2004)

Fehérje-folt	Azonosítási szám ^{a)}	Lefedtség (%) ^{b)}	Fehérje ID	Organizmus	Peptid-tömeg	Szekvencia	Azonosság (%) ^{c)}	Megjegyzés	Módszer
A rövid időtartamú hősokk következtében növekedett expressziót mutató fehérjék									
7.	gi1629223 4 AAB46378	17,3	Kis molekulatömegű HSP	<i>O. sativa</i>	1296.56	TTDSETAAFAGAR	78		MALDI TOF/TOF
					1584.79	IDWKETPDAAHVFK			
8.	gi1632174 5 AAK51797	42,2	17,8 kDa sHSP	<i>Triticum aestivum</i>	1307.60	FVLPENADMEK	91	Met ox	LC-MS/MS
					989.49	AMAATPADVK		Met ox	
					1291.61	FVLPENADMEK			
					1027.61	VLVISGERR			
					1818.01	DGVLTVTVEKLPPPEPK			
					2151.06	ELPGAYAFVVDMPGLGSG DIK		Met ox	
					3122.53	AMAATPADVKELPGAYAF VVDMPGLGSGDIK		2x Met ox	
	gi2196746 2AAK5179 7	23,1	17,8 kDa sHSP	<i>Triticum aestivum</i>	2193.07	ELPDFAFAFVVDMPGLGSG DIK	89	Met ox	LC-MS/MS
					3148.54	AMAAPADVKELPDAFAFV VDMPGLGSGDIK		Met ox	
					3164.54	AMAAPADVKELPDAFAFV VDMPGLGSGDIK		2 x Met ox	

4. táblázat (folytatása): A fajták között, valamint hőstressz hatására expressziós változást mutató fehérjék listája (SÜLE et al., 2004).

Fehérje - folt	Azonosítási szám ^{a)}	Lefedtség (%) ^{b)}	Fehérje ID	Organizmus	Peptid-tömeg	Szekvencia	Azonosság (%) ^{c)}	Megjegyzés	Módszer
A rövid időtartamú hősokk következtében növekedett expressziót mutató fehérjék									
	gi16321080 AAK51797	6,6	17,8 kDa sHSP	<i>Triticum aestivum</i>	1277.66	FVLDPNADMEK	87		LC-MS/MS
					1293.59	FVLDPNADMEK		Met ox	
9.	Nem azonosított								
10.	Nem azonosított								
11.	Nem azonosított								
A rövid időtartamú hőstressz következtében csökkent expressziót mutató fehérjék									
12.	gi21146652 QOO434	40,1	23 kDa oxigén felszabadító fehérje, kettes fotokémia rendszer	<i>Triticum aestivum</i>	1242.66	QYYSITVLTR	98		LC-MS/MS
					1561.74	KNTDFVAYSGEGFK			
					2083.02	TADGDEGGKHQLITATVADGK			
					3048.51	KTITDYGSPEEFLSQVGFLGQQSYGGK			

4. táblázat (folytatása): A fajták között, valamint hőstressz hatására expressziós változást mutató fehérjék listája (SÜLE et al., 2004).

Fehérje -folt	Azonosítási szám ^{a)}	Lefedtség (%) ^{b)}	Fehérje ID	Organizmus	Peptid- tömeg	Szekvencia	Azonos- ság (%) ^{c)}	Megjegyzés	Módszer
	gi24963702 P34937	22,1	Triózfoszfát izomeráz	<i>Hordeum vulgare</i>	1288.63	TNVSPEVAESTR	99		LC MS/MS
					1311.65	IYGGSVTGASCK		Carbami domethyl	
	gi16308176 CAC32847	17,4	Adenozin bifoszfát glükóz pirofoszfát	<i>Hordeum vulgare</i>	1262.69	VTFLDDAQVKK	99		LC MS/MS
					2504.07	LTQDFCVADLSCSDTPAGY PCK		3xCarba midomet hyl	
	gi12036592 AAL71854	15,3	Dehidroaszkorbát reduktáz	<i>Triticum aestivum</i>	1201.68	IFSTFVTFLK	95		LC MS/MS
					1826.84	AAVGHPDTLGDPCFSQR		Carbami domethyl	
13.	gi18228088 AAK16176	49	Transzláció iniciáló faktor 5A (eIF5A)	<i>O. sativa</i>	1087.58	TFPQQAGAIR	84		LC-MS/MS
					1310.75	LPTDDVLLGQIK			
					1419.70	CHFVAIDIFNGK		Carbami domethyl	
					2216.06	KLEDIVPSSHNCDVPHVDR		Carbami domethyl	
					2769.34	TGFADGKDLILSVMSAMG EEQICAVK		Carbami domethyl	

4. táblázat (folytatása): A fajták között, valamint hőstressz hatására expressziós változást mutató fehérjék listája (SÜLE et al., 2004).

Fehérje - folt	Azonosítási szám ^{a)}	Lefedettségi (%) ^{b)}	Fehérje ID	Organizmus	Peptid-tömeg	Szekvencia	Azonosság (%) ^{c)}	Megjegyzés	Módszer
A rövid időtartamú hőstressz következtében csökkent expressziót mutató fehérjék									
14.	gi9743953 CAA74953	30,9	Hipotetikus fehérje	<i>H. vulgare</i>	1059.56	SVGGITGDNLK	100		LC MS/MS
					1210.53	WDEGYDVTAR			
					1318.74	LKAGYVAANWVK			
					1778.87	DTNGIASTSGSTIELSAR			
					2466.15	QVLSDASSFTWGIFNQPD SDR			

a) A peptidszekvenciáknak megfelelő nukleotid kód (gi) a Biotechnológiai Információk Nemzeti Központjának honlapján (the National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://ncbi.nlm.nih.gov>.), valamint az EST-szekvenciából levezetett aminosav-szekvencia BLAST-keresőprogrammal (NCBI) végzett lekeresésének eredménye.

b) A lefedettség az EST-szekvencián belül a megszekvenált peptidfragmensek illeszkedésének nagyságára utal.

c) Az azonosság az EST-szekvenciából levezetett aminosav-szekvencia és ennek BLAST-adatbázisban történő lekeresésének eredménye közötti homológiára utal %-ban kifejezve.

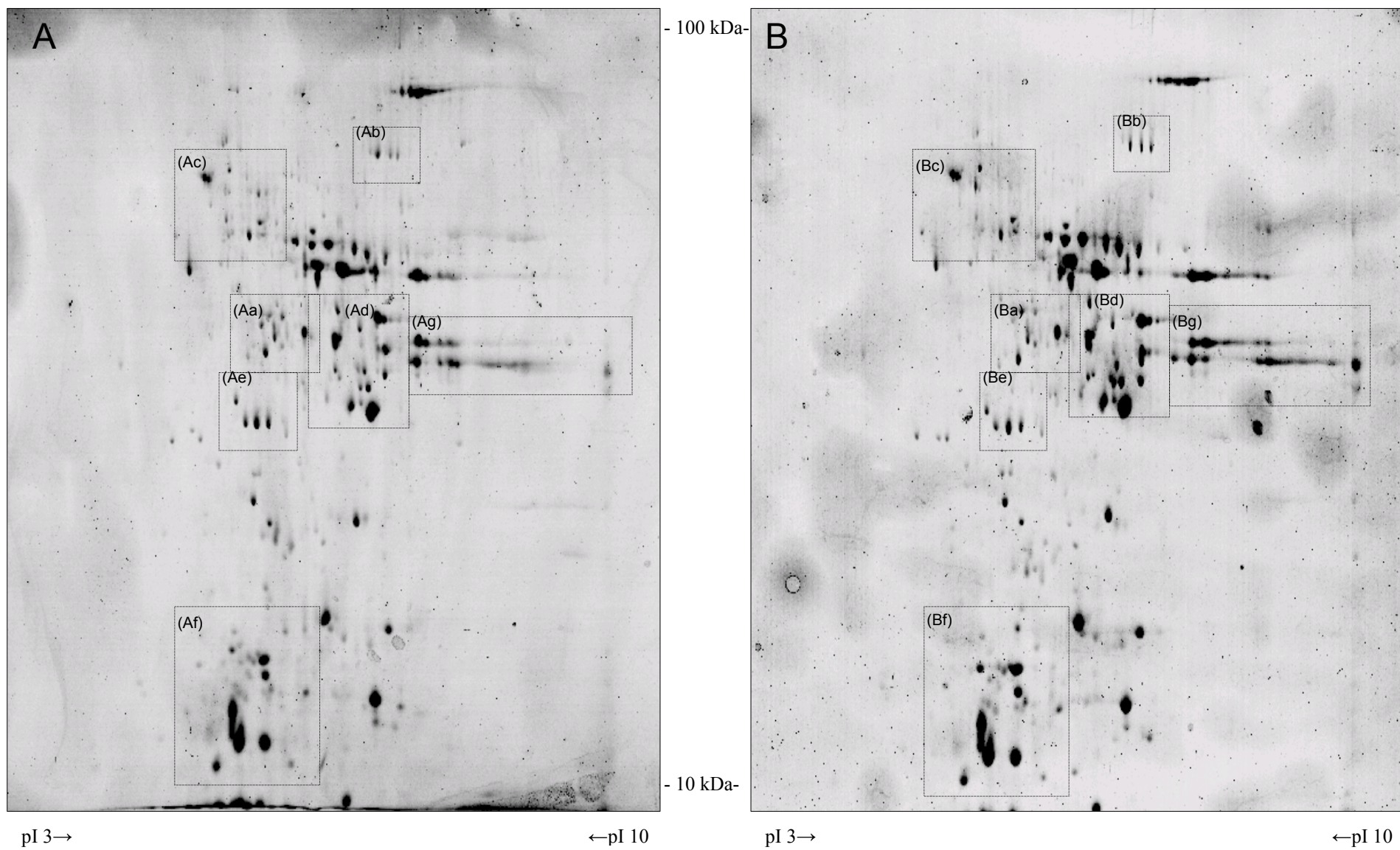
5.2 A különböző talaj-előkészítésből adódó nehezített termesztési körülmények hatásának nyomon követése a 'Jubilant' árpafajtában

A jelen kísérletben abból a szempontból vizsgáltuk a 'Jubilant'-nak - hazánk legkedveltebb sörárpa fajtájának - fehérjét, hogy a különböző talaj-előkészítésből adódó nehezített termesztési körülmények és a szárazság milyen hatással vannak a szintetizálódó fehérjék mennyiségére és minőségére.

Irodalmi adatok alapján a tavaszi árpa, különösen a sörárpa, kifejezetten igényes az előveteménnyel szemben. A sörárpa vetése előtt egyértelműen kerülendők a pillangósok, mert akár 150-250 kg/ha mineralizált N-t is visszahagyhatnak a talajban, ami a sörárpa minőségét ronthatja (TOMCSÁNYI és KISMÁNYOKY, 1993). LŐRINCZ (1984) szerint a sörárpa jó előveteményei a kukorica, a napraforgó és a búza; rossz előveteményei pedig a tavaszi és az őszi árpa, a pillangósok és a gyeptörés.

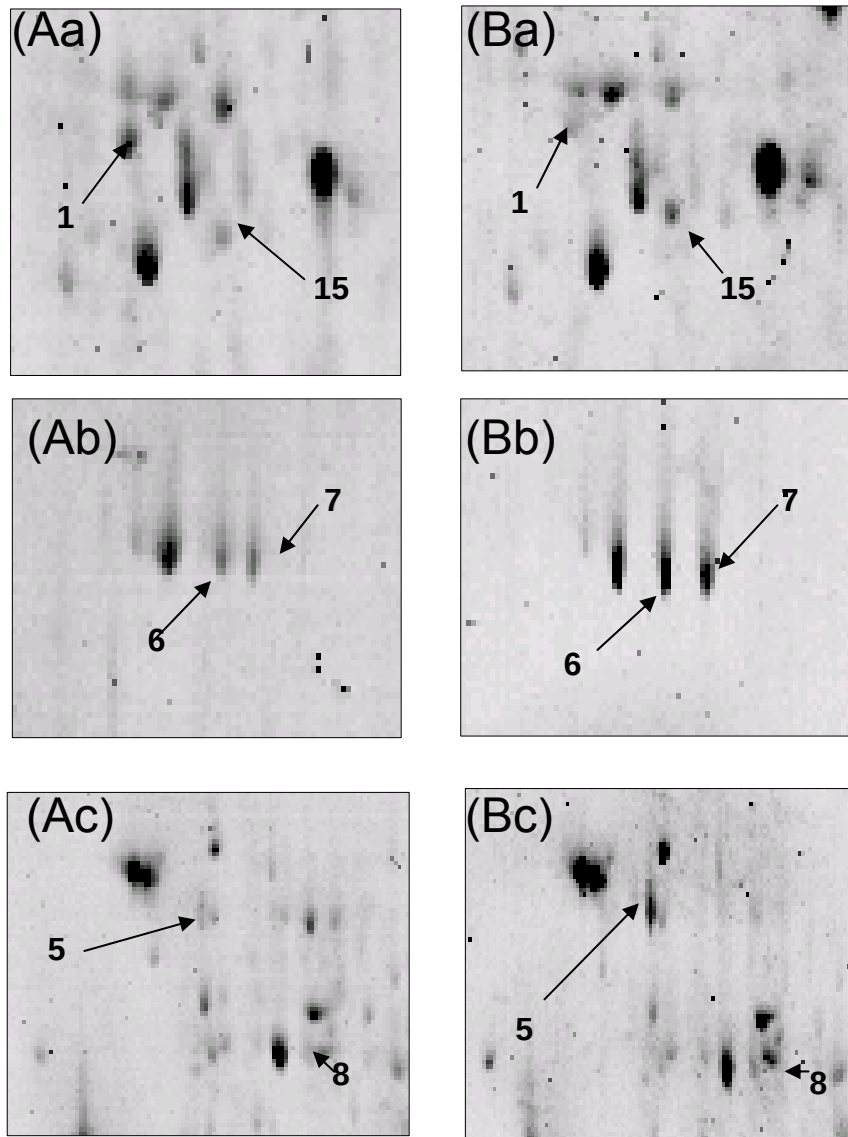
Ezen kívül a talajművelés minősége is egyértelműen meghatározza a sörárpatermesztés eredményességét. Így alapvető célja, hogy biztosítsa a tábla gyommentességét, az őszi-téli csapadék megőrzését és a laza, aktív talajélet fenntartására képes szerkezet kialakítását. A jó minőségű sörárpa talajművelésének egyik nagyon fontos mozzanata az őszi szántás, mivel az ősszel elmunkált szántások lényegesen jobban megőrzik a vizet.

A két különböző talaj-előkészítési körülményből származó árpa szemtermés karbamid-oldódó kétdimenziós fehérjemintázatának képei az alábbi 10. ábrán láthatóak, melynek kiemelt részleteit a 11. és a 12. ábrák mutatják be.

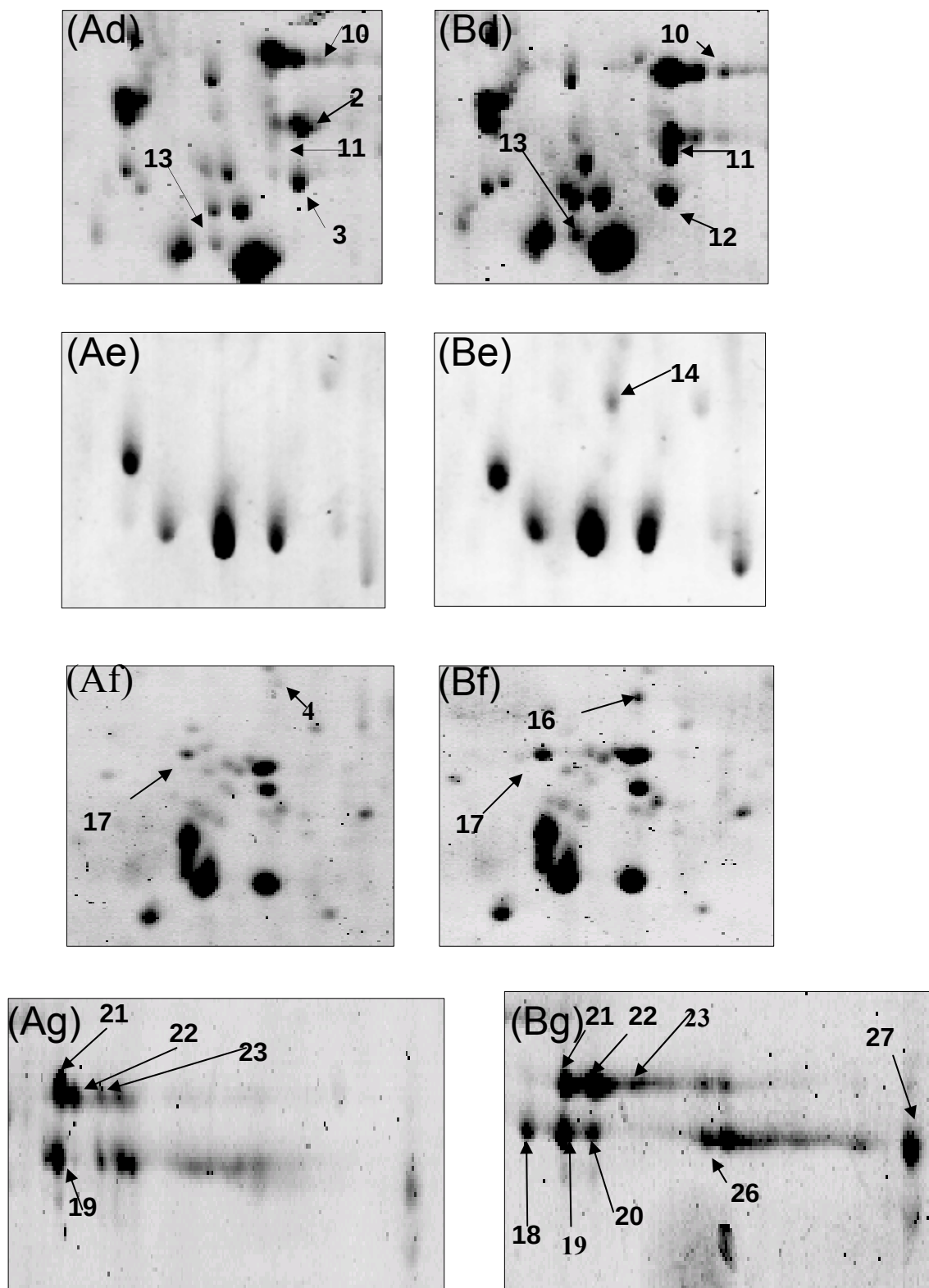


10. ábra: **A:** normál és **B:** nehezített termesztési körülményekben részesült 'Jubilant' árpa szemtermés karbamid-oldódó fehérjéinek kétdimenziós képei

A nehezített termesztési körülmények hatására számos mennyiségi különbség mutatkozott a géleken az egyes fehérjefoltok intenzitásbeli különbségéből adódóan. A változásokat az alábbi 10. és 11. ábrák képei mutatják be részletesebben, az 5. táblázat foglalja össze az azonosított fehérjék listáját.



11. ábra: **A:** a normál és **B:** a nehezített termesztési körülményekben részesült 'Jubilant' árpa szemtermés karbamid-oldódó fehérjéinek 9. ábráján látható kiemelések részletezett képei.



12. ábra: A: a normál és B: a nehezített termesztési körülményekben részesült 'Jubilant' árpa szemtermés karbamid-oldódó fehérjéinek 9. ábráján látható kiemelések részletezett képei.

5. táblázat: Expressziós változást mutató tömegspektrometriával (LC MS/MS) azonosított fehérjék.

Folt száma	Azonosított fehérje	Organizmus	Hivatkozási szám ^{a)}	Azonosság (%) ^{b)}	Kalkulált peptid MW (Da)	Kalkulált peptid pI (pI)
Nehezített körülmények között termesztett árpában kisebb intenzitást mutató fehérjék						
1.	Szerin proteáz inhibitor (Szerpin Z7)	<i>Hordeum vulgare</i>	Q43492	93	16856,44	5,18
2.	Nem azonosított					
3.	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz	<i>Triticum aestivum</i>	ABQ81648	98	28155,78	8,19
4.	22 kDa HSP (IV. Osztály)	<i>Glycine max</i>	P30236	37	13774,62	5,14
Nehezített körülmények között termesztett árpában nagyobb intenzitást mutató fehérjék						
5.	GroEL hő sokkfehérje Mitokondriális chaperonin 60	<i>Zea mays</i>	NP_001105690	95	17693,39	10,25
6.	Nem azonosított					
7.	Nem azonosított					
8.	Nem azonosított					
9.	Globulin2	<i>Zea mays</i>	1802402A	57	27096,64	9,94
10.	B3 hordein	<i>Hordeum vulgare</i>	P06471	99	30181,39	7,74
11.	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz	<i>Triticum aestivum</i>	ABQ81648	98	28155,78	8,19

5. táblázat (folytatása): Expressziós változást mutató tömegspektrometriával (LC MS/MS) azonosított fehérjék.

Folt száma	Azonosított fehérje	Organizmus	Hivatkozási szám ^{a)}	Azonosság (%) ^{b)}	Kalkulált peptid MW (Da)	Kalkulált peptid pI (pI)
Nehezített körülmények között termesztett árpában nagyobb intenzitást mutató fehérjék						
12.	Glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz	<i>Triticum aestivum</i>	ABQ81648	98	28155,78	8,19
13.	Peroxidáz	<i>Hordeum vulgare</i>	1BGP_A	100	33825,21	6,51
14.	Nem azonosított					
15.	Nem azonosított					
16.	22 kDa HSP (IV osztály) prekursor	<i>Glycine max</i>	P30236	37	13774,62	5,14
17.	Nem azonosított					
A bázikus régió azonosított fehérjéi						
18.	Gamma 2 hordein	<i>Hordeum vulgare</i>	CAE45747	98	18047,78	8,54
19.	Gamma 2 hordein	<i>Hordeum vulgare</i>	CAE45747	98	18047,78	8,54
20.	Nem azonosított					
21.	Nem azonosított					
22.	B1 hordein	<i>Hordeum vulgare</i>	CAA60681	90	16117,58	8,45
23.	Nem azonosított					
24.	Nem azonosított					
25.	B1 hordein	<i>Hordeum vulgare</i>	CAA60681	90	16117,58	8,45
26.	B1 hordein	<i>Hordeum vulgare</i>	CAA60681	90	16117,58	8,45
27.	B1 hordein	<i>Hordeum vulgare</i>	CAA60681	90	16117,58	8,45

a) Az EST-szekvenciából levezetett részleges aminosavsorrend BLAST-keresőprogrammal (NCBI) végzett lekeresésének eredménye. **b)** Az azonosság az EST-szekvenciából levezetett aminosav-szekvencia és ennek BLAST-adatbázisban történő lekeresésének eredménye közötti homológiára utal %-ban kifejezve.

5.2.1 Tömegspektrometriával azonosított fehérjék jellemzése

Nehezített termesztési körülmények között termesztett árpában - a normál kontroll körülmények között termesztetthez képest - kisebb intenzitást mutató fehérjék között az 1-es számmal jelölt fehérje (11. ábra Aa és Ba képei) EST/DNS-adatbázis alapján történő azonosítása során a *Hordeum vulgare* szerin proteáz inhibitor Z7-tel mutatott nagy homológiát (93%). Az érett árpa szemtermésben a szerpinek tiol-kötésben vannak jelen (ROSENKRANDS et al., 1994), és a csírázás alatt szabadulnak fel ebből az állapotból. Jelenleg pontos funkciójuk még ismeretlen. A szerpin Z7 túléli a malátázás alatti proteolitikus aktivitást és a sörfőzés alatti enzimatisz behatásokat is, az árpából a sörbe kerülve annak fő fehérjekomponensét alkotja. A szerpinek a lipid transfer fehérjékkel együtt a sör habstabilitásának kialakításában játszanak nagy szerepet (EVANS és HEJGAARD, 1999), 'hab-pozitív' fehérjének is hívják őket. A szerpin Z7 és Z4 között aminosav-szekvencia szinten 70%-os azonosságot találtak (DAHL et al., 1996), mely azért fontos, mert négy sörre allergiás ember vérérumának vizsgálatakor mindannyian IgE mediált immunreakciót mutattak a szerpin Z4-el szemben (GARCÍA-CASADO et al., 2001). A nehezített termesztési körülmények és az ennek következtében fellépő szárazság hozzájárultak expressziójának csökkenéséhez. ØSTERGAARD és munkatársai (2004) a csírázó árpa szemtermésben a szerpinek számos izoformját mutatták ki.

A 12. ábra Af és Bf képein a 4-es jelű fehérjefoltjából azonosított fehérje a *Glycine max* 22 kDa hősokkfehérjével (IV osztály) mutatott homológiát. A fehérje expressziója csökkent a nehezített körülmény hatására. A részletezett 12. ábrán látható, hogy a 4-es jelű fehérje közelében a nehezített körülmények hatására a 16-os számú fehérjefolt jelenléte detektálható, mely egy szintén chaperonin aktivitással rendelkező és a HSP20 családba tartozó fehérjével, a 22.0 kDa HSP (IV. osztály) prekuzorral mutatott azonosságot. Feltételezhető, hogy a 16-os jelű hősokkfehérje prekuzor azért jelenik meg az alacsonyabb molekulatömegű régióban, mert ez a nehezített termesztési körülmények hatására bekövetkező növényi védekezés része.

Ezen kívül a bázikus régióban, a 12. ábra Ag és Bg képein számos, a *Hordeum vulgare* hordein fehérjével homológ fehérjék expressziója is megfigyelhető a nehezített körülmények hatására: a 18 és 19-es számú fehérjefoltokban az árpa gamma 2 hordeinjével homológ fehérjéket sikerült azonosítanunk, a 22., 25., 26. és 27. fehérjefoltokban a B1 hordeinnel azonosságot mutató fehérjéket detektáltunk.

A 11. ábra Ac és Bc képein az 5. fehérjefolt, a GroEL hősokkfehérjével volt homológ (mitokondriális chaperonin 60), és normál körülmények között is mutatott expressziót, de a nehezített körülmények és a szárazság hatására mennyisége láthatóan növekedett. Ugyanez mondható el az árpa peroxidáz enzimével homológiát mutató 13. fehérjéről is (12. ábra Ad és Bd

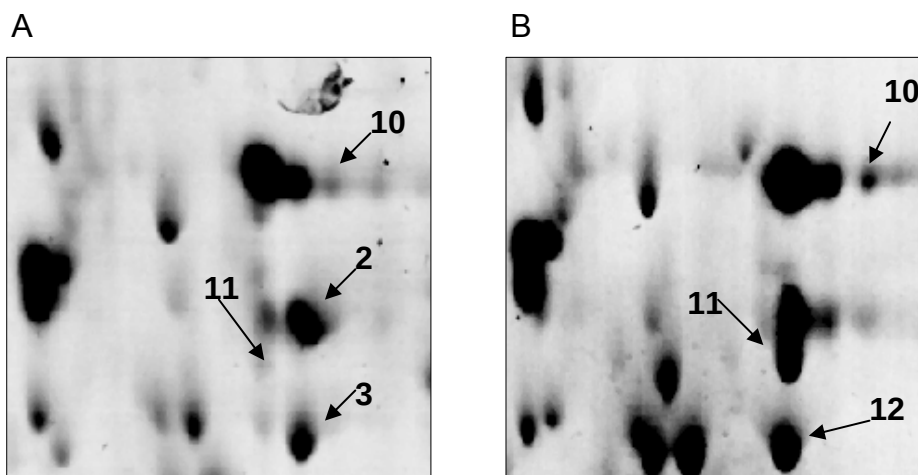
képek). A növényi peroxidázoknak több izoformja, sőt több családja is létezik, az általunk izolált fehérje egy kiválasztásra kerülő peroxidázzal mutatott homológiát, mely a növényi hem-függő peroxidáz szupercsalád III. osztályába tartozik. Az extracelluláris térben vagy pedig a vakuolumban helyezkedik el, és szerepe van a hidrogén peroxid detoxifikálásában, auxin katabolizmusban, lignin bioszintézisben és a stresszválaszokban. A növényi genomban több gén kódolja a peroxidázokat, melyek közül csak néhány mutat expressziós változást patogének hatására (CHITTOOR et al., 1999). A peroxidáz enzim mennyiségének növekedését szárazságstressz hatására kukoricában tapasztalták proteomikai módszerekkel (ALVAREZ et al., 2008).

A továbbiakban a 13. ábrán bemutatott glikolízisben részt vevő glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázzal homológiát mutató fehérjéket is sikerült azonosítani azok között a fehérjék között, melyek a nehezített termesztési körülmény hatására változott expressziót mutattak. Ez a normál szántóföldi körülmények során a 3-as pozícióban expresszáldott, de mivel a szárazság és a nehezített körülmények hatására valószínűsíthetően poszttranszlációs módosuláson ment át és izoelektromos pontja megváltozott, így 12-es pozícióba került. Ezt reprezentálja a 13. ábrán bemutatott gélkép is. Az előzőekhez hasonló változást figyelhetünk a 13. ábrán, abban hogy a normál körülmények között expresszáldott 2-es fehérje szárazság hatására 11-es pozícióba kerül. A 11-es fehérjét is a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázként azonosítottuk.

A glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz enzim nemcsak a glikolízisben vesz részt, hanem a transzkripciós szabályozásban is szerepe van (KIM és DANG, 1993). BAK-JENSEN és munkatársai (2004) a dán 'Barke' sörárpa szemterméséből és malátájából származó bázikus fehérjék vizsgálatakor (pH 6-11 intervallum) hat fehérjefoltot azonosítottak glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázként (GAPDH), mely arra utal, hogy a szemtermésben és malátában normál termesztési körülmények között is több izoformában fordul elő a GAPDH enzim. SANDER és munkatársai (2001) 10 'baker's asthma' betegségben szenvedő ember szérumának vizsgálatakor a 'Bussard' búzafajta víz-só oldható fehérje frakciójában több IgE kötő fehérjét találtak az elektroforetikus immunoblott segítségével, melyek között az árpa GAPDH enzimével nagy homológiát mutató két GAPDH izoenzim is jelen volt a szerin proteáz inhibitorral együtt.

A jelen kísérletben bemutatott ugyanazon fehérje több pozícióban történő megjelenése utalhat az izoformok eltérő szerepére, a növényi szövetek eltérő izoform regulációjára és poszttranszlációs módosulásra is a nehezített termesztési körülmény hatására.

A 13. ábra képein még feltűnik a 10-es jelű B3 hordeinként azonosított fehérje, melynek expressziója szintén növekedett a nehezített körülmények hatására.



13. ábra: **A:** normál termesztési körülményekben és **B:** nehezített termesztési körülményekben és szárazságban részesült Jubilant árpa szemtermés karbamid-oldódó fehérjéinek kétdimenziós részletezett képei az Ad és Bd képek alapján.

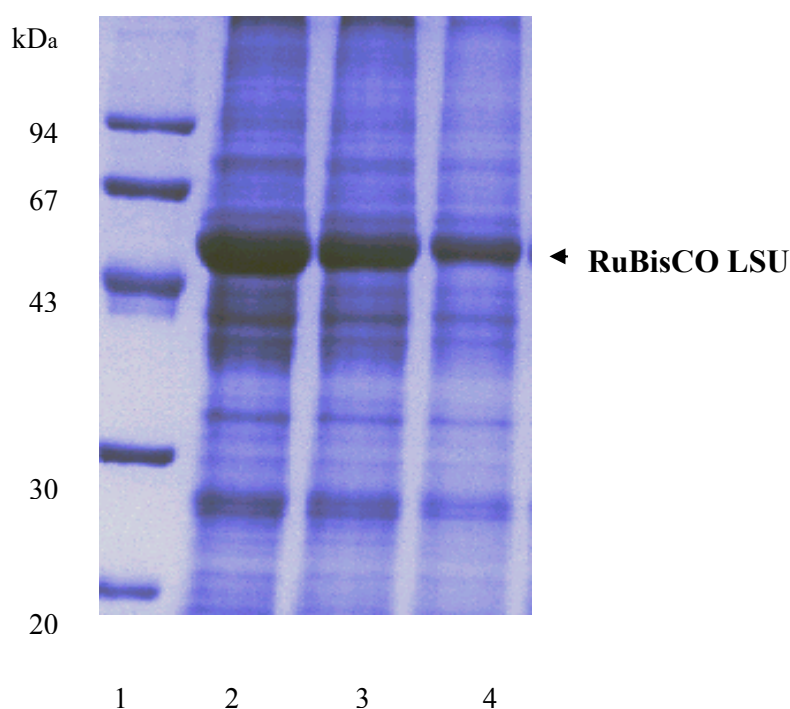
5.3 A kadmium hatásának vizsgálata az árpa levélsírájának fehérjeexpressziójára

A különböző kadmiumszennyezettségek által kiváltott növényi adaptáció és kadmiummal szembeni tolerancia speciális biokémiai és molekuláris alapjai még csak részlegesen ismertek. Az azonban már elfogadott tény, hogy a fitokelatinok és stresszfehérjék nagyon jelentős szerepet játszanak a kadmium detoxifikációjában és a tolerancia kialakulásában. Eddig proteomikai megközelítésű kísérletek - a kadmium által kiváltott stresszválasz kapcsán - élesztőkben a *Saccharomyces cerevisiae* (VIDO et al., 2001) és *S. Pombe* (BAE és CHEN, 2004) és növények közül az *Oryza sativa* L. (HAJDUCH et al., 2001) és *Arabidopsis thaliana* (SARRY et al.; 2006) eseteiben folytak.

A jelen kísérlet célja az volt, hogy az árpa levélsíra fehérjéinek szintjén ellenőrizzük a kadmium által kiváltott stresszválaszt a kétdimenziós elektroforézis kínálta lehetőségekkel. Mivel előzetesen már többen folytattak kísérletet a kadmium különböző koncentrációban való adagolásának hatásáról, így mi azt az 50 μM feletti kadmiumkoncentrációt alkalmaztuk, ahol már a levél vezetőképessége és CO_2 felvétele is jelentős csökkenést mutatott (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002).

A kísérlet folyamán különböző koncentrációjú (200 μM és 1 mM CdCl_2) kadmiumkezelések hatását követtük nyomon a 'Jubilant' árpa levélsírájának proteomikai vizsgálatával. A kontroll és a Cd stressznek kitett növények hét napon át 24°C-on növekedtek megfelelő kadmiumszennyezettségnek kitett földben. A kezelések hatására az árpa levélsírájának hossza szignifikánsan csökkent a Cd-dózisának függvényében. A kadmiummal kezelt növények oldódó fehérjéinek egydimenziós elválasztása során jelentős különbségeket találtunk, melyet a 16. ábra

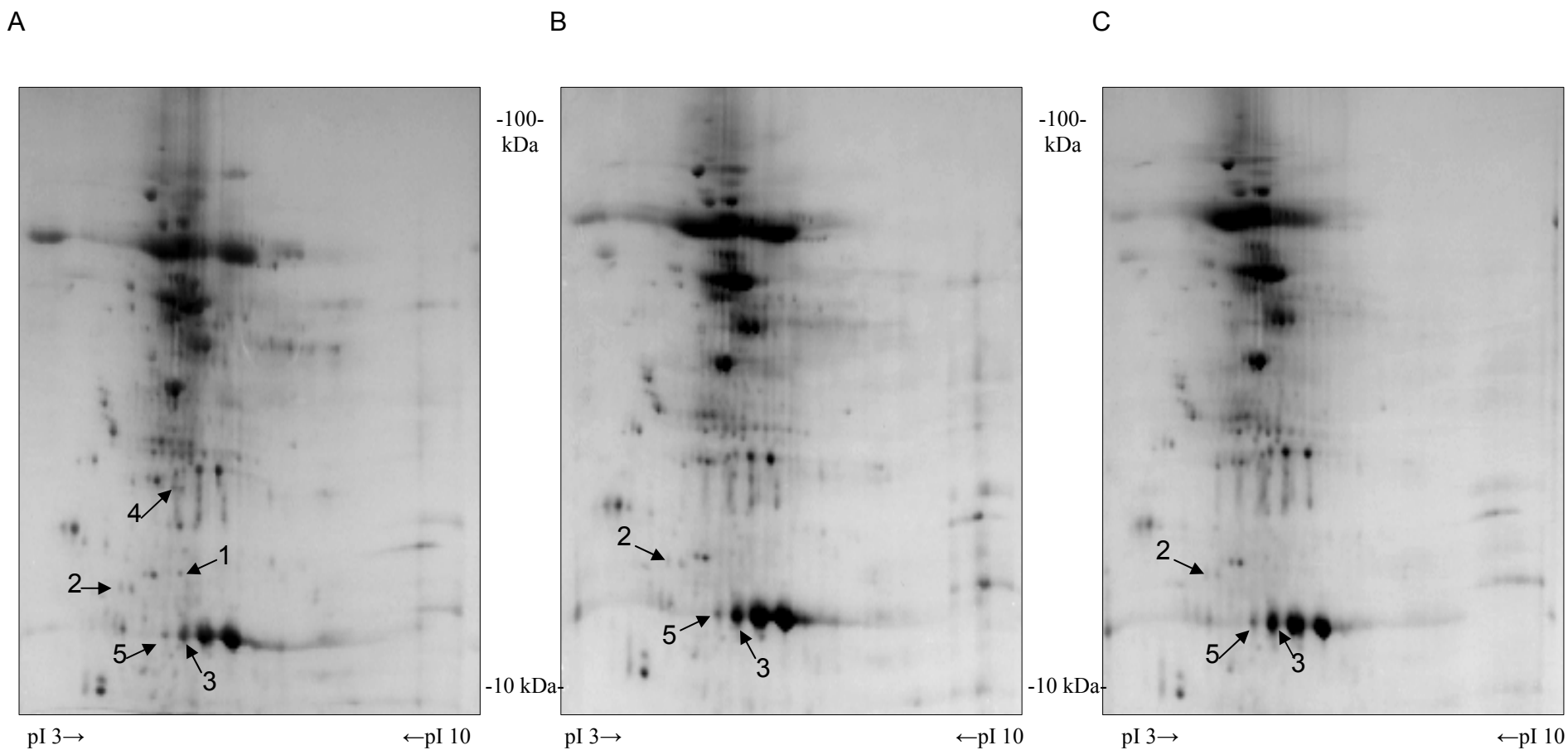
is bemutat. Amikor a 'Jubilant' sörárpa levélcsíra karbamid-oldódó fehérjéit SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk, az egyes kezelések között és a kontrollhoz képest jelentős fehérjeexpressziós változást figyeltünk meg: a kadmiumkezelés koncentrációjának növekedésével a karbamid-oldódó fehérjék mennyisége jelentősen lecsökkent. Az 14. ábrán külön kiemeltem a Föld legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérjéjének, a ribulóz-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz (RuBisCO) (ELLIS, 1979) nagy alegységének a fehérjesávját, mely denzitásának jelentős csökkenése jól demonstrálja a kadmium fotoszintézisre gyakorolt károsító hatását. A RuBisCO egy óriási, sztrómában lévő enzimkomplex (molekulatömege 500.000 Da körül van), elsődleges feladata a CO₂-t fixálása.



14. ábra: A 'Jubilant' sörárpa levélcsíra karbamid-oldódó fehérjéinek SDS-poliakrilamid gélen történő elválasztása azonos mennyiségű szárazanyagból való fehérje kioldást és azonos térfogatú (4 µl) mintafelvitelt követően **1:** molekulatömeg standard **2:** kezeletlen minta esetén, **3:** 200 µM CdCl₂ kezelést és **4:** 1 mM CdCl₂ kezelés után.

A 200 µM és az 1mM CdCl₂ kezelések hatásának további tanulmányozása céljából kétdimenziós elválasztást végeztem, melyet a 15. ábrán mutatok be, ahol a kontroll és kezelt mintákat 2-2 párhuzamosban ismételt meg, kezelésenként egyforma mennyiségű fehérjét elválasztva. A kiértékelés során az egyes párhuzamosokból képeztem csoportokat. Az ismétlésekben magas volt a fehérjefoltok reprodukálhatósága, amely tükröződött a szórási görbe regressziós egyenesének korrelációs koefficiense 80% feletti értékeiből és az átlagos variációs együttható (CV < 37%) adataiból is.

A kiértékelésben három csoportot képeztem, melyek magas reprodukálhatósági értékük alapján egyenként 2-2 párhuzamost tartalmaztak. A csoportok fehérjefoltjainak relatív integrált denzitás értékét hasonlítottam össze; majd azon fehérjéket vizsgáltam tovább tömegspektrometriás analízissel, melyek $p < 0,05$ statisztikai megbízhatóság mellett legalább kétszeres eltérést mutattak a denzitás értékükben.. Hét napon át különböző kadmiumkoncentrációk a levélcsíra fehérjeexpressziós profilját megváltoztatta. A különbségek nagy része az alacsony, főként a 15–30 kDa molekulatömeg és 4.0–9.0 pH-tartományban volt érzékelhető. A megváltozott expressziót mutató fehérjefoltokat az alábbi ábrán számokkal jelöltem, a foltok listáját pedig a 6. táblázat mutatja be.



15. ábra: A 'Jubilant' karbamid-oldódó fehérjéinek kétdimenziós poliakrilamid gélen történő elválasztása azonos mennyiségű fehérje felvitelekor **A:** kezeletlen minta esetén, **B:** 200 μM CdCl₂ és **C:** 1 mM CdCl₂ kezelés után.

6. táblázat: Expressziós változást mutató fehérjék azonosítása MALDI-TOF MS-sel.

Folt száma	Azonosított fehérje	Organizmus	Hivatkozási szám	Lefedettség (%) és helyes találati arány	Kalkulált MW (Da)	Kalkulált pI (pI)
Csak a kezeletlen kontroll mintában expresszáldó fehérje						
1.	Nem azonosított					
A kontroll mintában nagyobb expressziót mutató fehérjék						
2.	Ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz nagy alegység	<i>Hordeum erectifolium</i>	gi31087877 AAN27973	26 11/35	53285	6,13
4.	Oxigénfelszabadítást növelő fehérje 2 (OEE2)	<i>Triticum aestivum</i>	gi131394 Q00434	47 13/31	27424	8,84
Egyéb azonosított fehérjék						
3.	Ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz kis alegység	<i>Hordeum vulgare</i>	gi4038691 BAA35162	56 11/39	18574	8,8
5.	Ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz-oxigenáz kis alegység	<i>Hordeum vulgare</i>	gi3914588 Q40004	53 12/39	19421	9,0

5.3.1 Tömegspektrometriával azonosított fehérjék jellemzése

A 15. ábrán az 1-es számmal jelölt fehérje expressziója csak a kezeletlen, kontroll mintában volt érzékelhető, de sajnos ennek a fehérjének a tömegspektrometriás azonosítása a kevés tömegspektrum-információ miatt sikertelen volt.

A 17. ábrán a 2-es számmal jelölt fehérje - mely a kontroll mintában nagyobb intenzitást mutatott - a *Hordeum vulgare* ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz nagy alegységének fragmentjével 26%-os lefedettséget mutatott. Az egydimenziós SDS gélen a különböző

kadmiumkoncentrációk hatására is megfigyelhető volt a RuBisCO nagy alegységének mennyiségi csökkenése, melyet az alegység kadmium hatására történő nagyfokú degradációja okozott. A következő, kontroll mintában nagyobb intenzitást mutató fehérje a 4-es számmal jelölt volt, mely a *Triticum aestivum* kloroplasztiszból származó oxigénfelszabadítást növelő fehérjével (OEE2) mutatott 47%-os lefedettséget. Ez a fehérje a PSII OEC komplexének egyik fehérjéje. A komplex feladata a vízből molekuláris oxigén felszabadítása. Kadmium kezelés hatására már HAJDUCH és munkatársai (2001) is megfigyelték az OEE2 expressziójának csökkenését kétdimenziós elválasztás során.

A fehérjék között ezen kívül detektáltuk a 3. és 5. fehérjét, melyek az adatbázis fehérjei közül a *Hordeum vulgare* ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz kis alegységeivel mutatták a legnagyobb homológiát.

5.4 Évjáratok hatásának ellenőrzése a víz-só oldható proteom szintjén

Az árpát söripari felhasználása céljából szigorú minőségi követelményeknek vetik alá, így csak a nagy szemű és ezért relatíve alacsonyabb fehérjetartalmú árpa (<12,5%) használható fel malátagyártásra és sörfőzésre. Habár a sörben a fehérjemennyiség igen csekély - az árpa fehérjetartalmából a kész sörbe egyharmad résznyi kerül, - mégis lényegesen befolyásolja a sör minőségét, kedvezőtlenül hatva a sör habstabilitására, szűrhetőségére és a sör zavarosságának keletkezésében is fontos szerepe van.

Vizsgálatainkban célul tűztük ki a modern proteomika eszközeinek (2D-PAGE, MS) felhasználásával azt, hogy két különböző évjárat hatását ellenőrizzük a 'Jubilant', 'Bivoy' és 'Mandolina' sörárpafajták víz-só oldható fehérjeinek expressziójára.

A vizsgálat során az árpa 2,5 mm-nél nagyobb szemcseméretű magjait kiválogattuk, mivel csak ezek a magok kerülnek malátázásra, azt követően pedig söripari hasznosításra, majd mintánként két-két párhuzamossal dolgozva a víz-só oldható fehérjét kétdimenziós elektroforézissel választottuk szét, melyeket a 16., 17. és 18. ábrákon mutatunk be.

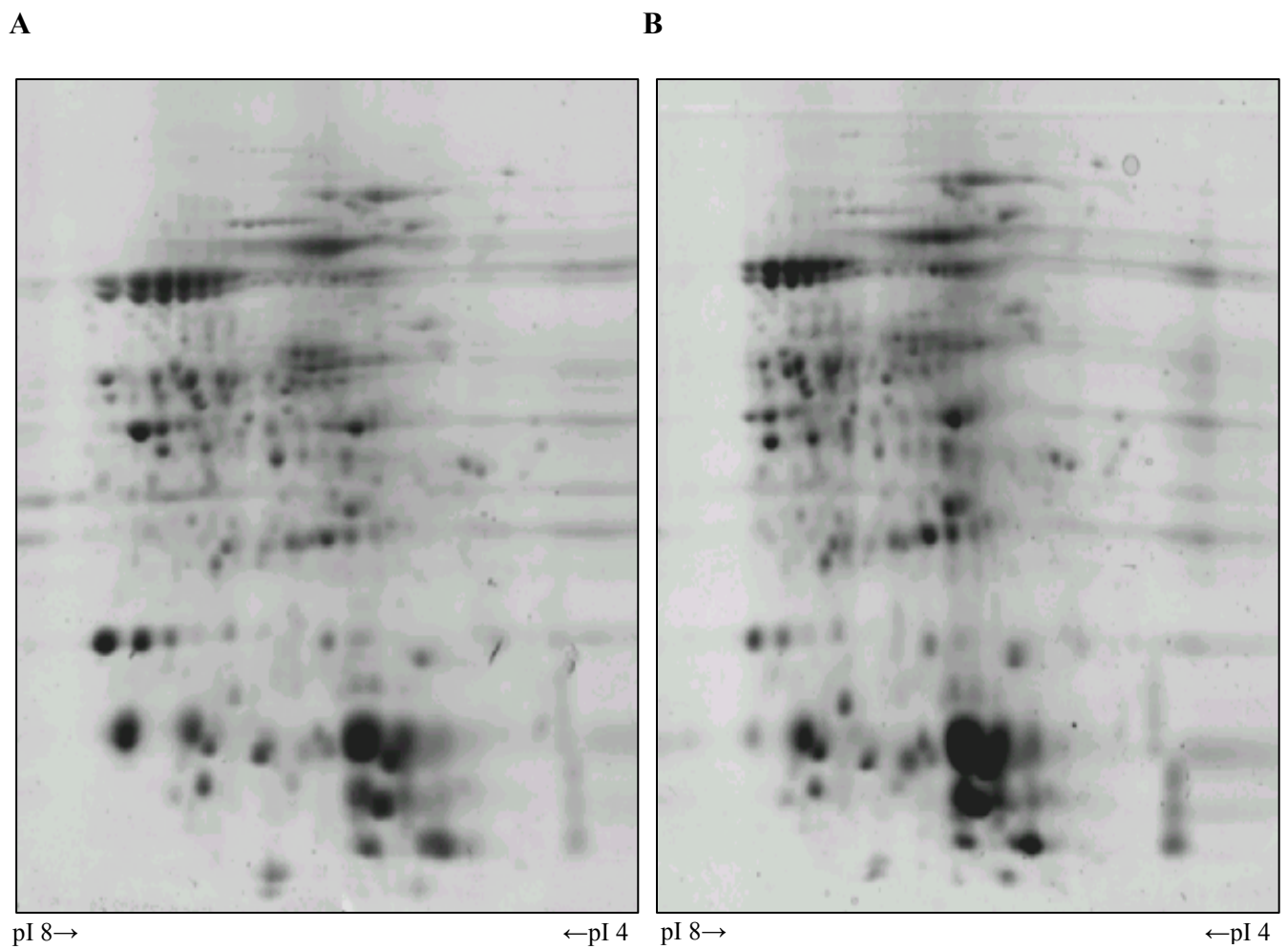
A 7. táblázatban foglaltuk össze a tavaszi árpa tenyészidejében a 2002 és 2003 évekre vonatkozó csapadék- és hőmérsékletadatokat a napfényes órákkal együtt. Ebből kitűnik, hogy a 2002-es évben is kevés csapadék hullott, de 2003-ban még ennél is kevesebb. Ekkor a csapadékhiány hatását az igen meleg június tovább fokozta. 2002-ben a 'Jubilant' és 'Bivoy' fajták sörgyártásra megfelelő kihozatalt értek el, de a 2003-as évben ezen fajták gyenge eredményt produkáltak a 'Mandolina' mindkét évi alacsony teljesítményével együtt. A fajták gyenge teljesítménye elsősorban a söripari minőség megállapításában kardinális osztályozottsági értékekben mutatkozott meg, ahol a 2,5 mm-nél kisebb szemtermés mennyisége nagy volt a

követelményekben megfogalmazott értékekhez, valamint az elmúlt kedvezőbb időjárási feltételekkel rendelkező évekhez képest.

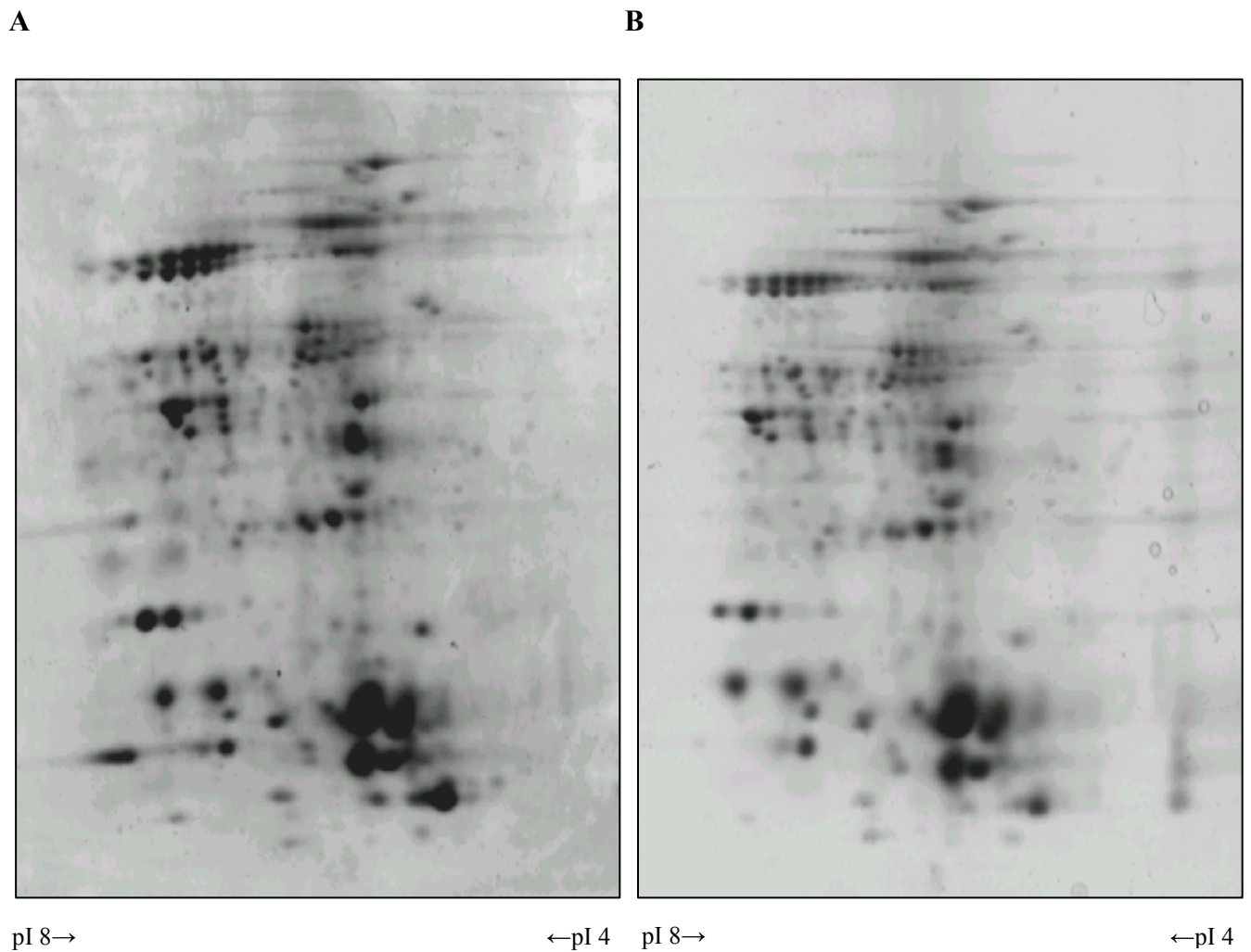
7. táblázat: Időjárási adatok 2002 és 2003 évekből a tavaszi árpa tenyészidejében

Hónap	csapadék, mm			hőmérséklet, °C			napfényes órák		
	2002	2003	40 éves atlag	2002	2003	40 éves atlag	2002	2003	40 éves atlag
március	12,5	2,8	34,3	8,2	6,2	5,7	159,8	164,8	130,1
április	51,8	49,0	39,5	11,0	10,0	10,4	152,0	183,3	175,1
május	44,8	27,4	61,7	19,1	18,7	15,8	257,7	271,4	232,9
június	48,0	47,8	80,4	21,4	23,2	19,0	235,8	273,4	229,7
július	83,3	74,2	78,6	23,1	22,4	20,9	287,2	286,3	253,4
márc- júl	240,4	201,2	294,4	16,6	16,1	14,4	1092,5	1179,2	1021,1

A különböző évjáratok víz-só oldható fehérjéinek fajtánkénti kétdimenziós összehasonlításával azonban nem sikerült reprodukálható különbségeket felfedeznünk az évjáratok között. Az eltérő söripari minőség a vizsgálataink alapján nem volt detektálható a 2,5 mm-nél nagyobb szemcseméretű árpa víz-só oldható fehérjéinek a szintjén.



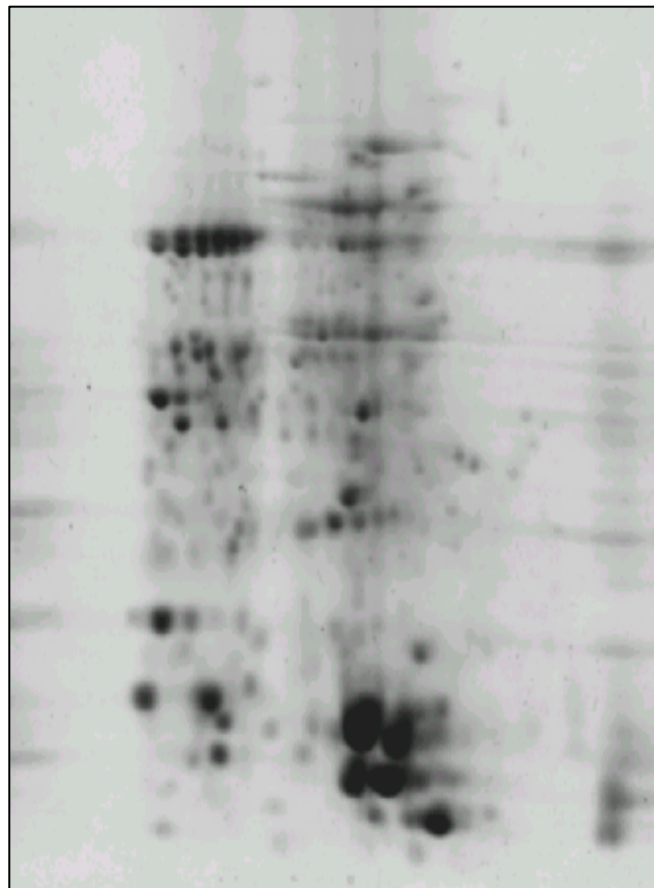
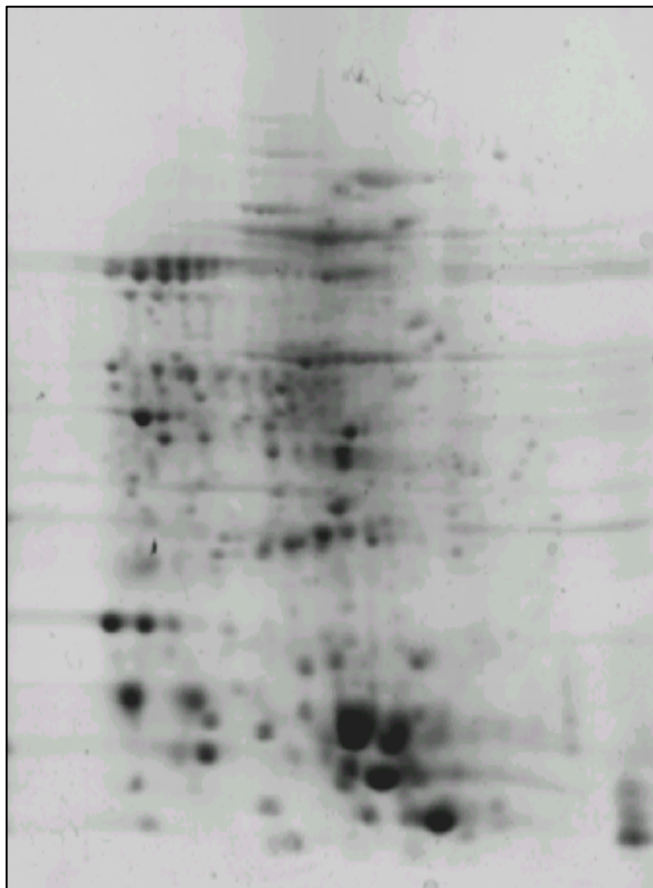
16. ábra: A 'Bivoy' víz-só oldható fehérjéinek kétdimenziós mintázata **A:** 2003-as, **B:** 2002-es minták esetén.



17. ábra: A 'Jubilant' víz-só oldható fehérjéinek kétdimenziós mintázata **A:** 2003-as, **B:** 2002-es minták esetén.

A

B



pI 8→

←pI 4

pI 8→

←pI 4

18. ábra: A 'Mandolina' víz-só oldható fehérjéinek kétdimenziós mintázata **A:** 2003-as, **B:** 2002-es minták esetén.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Megállapítottam, hogy a környezeti stresszhatásoknak ellenálló 'Mandolina' és 'Bivoy' árpában is detektálható a SAM-S enzim egy olyan izoformja, mely a 'Jubilant' környezeti anomáliákra érzékeny fajtában nem mutatható ki. Az eredményem alapján azt a következtetést vontam le, hogy ennek az izoformnak a hiánya is közrejátszhat a 'Jubilant' árpafajta környezeti hatásokkal szembeni érzékenységében.
2. A 'Jubilant' és 'Mandolina' árpafajták hőmérsékleti stresszhatásra adott válaszreakciójának vizsgálatakor megállapítottam, hogy számos kis moltömegű hősokkfehérje (16,9 kDa, 17,8 kDa, sHSP) képződött a stresszhatás következtében, melyek nagy homológiát mutattak a rizs és a búza hősokkfehérjéivel. A hősokkfehérjék több izoformában is detektálhatóak voltak és expressziós különbséget mutattak a két árpafajtában.
3. A különböző talaj-előkészítési körülményekből adódó nehezített körülmények és szárazság hatásának nyomon követése folyamán a 'Jubilant' árpában számos, a külső körülmények hatására megváltozott expressziót mutató karbamid oldódó fehérjét azonosítottam. A kísérletben bizonyítottam, hogy az adott termesztési körülmény megváltoztathatja egyes fehérjék expresszióját.
4. Azonosítottam a glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenázzal homológ fehérjéket a nehezített körülmények hatására megváltozott pozícióban expresszáldó fehérjék között. Ez a megfigyelés utalhat: az izoformok eltérő szerepére, a különböző szemtermésalkotók különböző izoform regulációjára és a nehezített termesztési körülmény hatására bekövetkező poszttranszlációs módosulásra.
5. A különböző talaj-előkészítési körülmények hatásának vizsgálatakor megállapítottam, hogy a nehezített körülmények és a szárazság következtében számos védekezésben részt vevő enzim expressziója növekedett. Így azonosítottam egy 22,0 kDa (IV osztály) hősokkfehérje prekuzorral, a GroEL hősokkfehérjével és a peroxidáz enzim egyik izoformjával homológ fehérjét.
6. A nehezített és normál kontroll körülmények között termesztett árpa szemtermés karbamid-oldódó proteomjának összehasonlításakor a szerin proteáz inhibitor Z7 intenzitásának csökkenését figyeltem meg a nehezített körülmények hatására. A jelen kísérlettel egy olyan

termesztési körülményt azonosítottam, mely kifejezetten negatív hatással van a sör habstabilitásának kialakításában szerepet játszó fehérje mennyiségére, valamint a hordein fehérjék fokozott szintézisét okozza.

7. 200 μM és 1 mM kadmium-klorid kezelések hatásának proteomikai vizsgálatokor megállapítottam, hogy a kontroll mintához képest a RuBisCO nagy alegységének mennyisége csökkent, melyet a kadmium hatására bekövetkező nagyfokú fehérje degradáció okozott. Ezen kívül a kezelések hatásaként az oxigénfelszabadítást fokozó fehérje (OEE2) expressziójának csökkenését is detektáltam. Eredményeimmel ezen fehérjék kadmium által kiváltott expressziós változását az elsők között igazoltam proteomikai módszerekkel az árpában.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során proteomikai módszerekkel (2-DE, MS) megvizsgáltam a sörárpák fehérjéinek a különböző abiotikus stresszhatások miatt bekövetkező expressziós változását, mint amilyen a magas hőmérséklet, a különböző termesztési körülmények, a kadmiumszennyezettség és a szárazság. A védekezésében részt vevő fehérjék megismerése mellett sikeresen mutattam be, hogy ezek a stresszhatások miként befolyásolják élelmiszeripari nyersanyagaink fehérje-összetételét. Proteomikai vizsgálataim fényt derítettek arra, hogy a különböző árpafajták fehérje-összetétele a környezeti stresszhatások következtében jelentősen módosul. A kétdimenziós elektroforézist eredményesen alkalmaztam tömegspektrometriával kombinálva, annak ellenére is, hogy az árpa genomszekvenciája még csak részben ismert. A legtöbb különbséget mutató fehérjét tudtam azonosítani a különböző MS-technikák MS vagy MS/MS módban való működtetése révén.

A munkám első felében a környezeti stresszhatásokra érzékeny ('Jubilant') és ugyanezen stresszhatásokra rezisztens ('Mandolina') árpafajták levélcsírájának kétdimenziós fehérjemintázatát hasonlítottam össze, és a 'Mandolina' fajtában a SAM-S enzim egyik izoformját detektáltam, mely a 'Jubilant' környezeti anomáliákra érzékeny fajtában nem volt kimutatható. A SAM-S ezen izoformjának expresszióját emellett a 'Bivoy' fajtában is kimutattam. A 'Jubilant' és 'Mandolina' árpafajták rövid ideig tartó hőmérsékleti stresszhatásra adott válaszreakciójának vizsgálatakor számos kis moltömegű hősokkfehérje és ezek izoformjainak képződése is megfigyelhető volt.

A kísérleteim további részében azt követtem nyomon, hogy a 'Jubilant' tavaszi árpafajta szemtermésében miként változik a karbamid-oldható fehérje-összetétele a különböző talaj-előkészítési és termesztési körülmények hatására. A különböző termesztési körülmények nyomon követése során számos, a külső körülmények hatására megváltozott expressziót mutató fehérjét sikerült azonosítani (22,0 kDa (IV család) hősokkfehérje prekuzort, a GroEL hősokkfehérjét, peroxidáz enzimet, gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz három izoformját). A kísérletben bemutattam, hogy az adott termesztési körülmény nemcsak elősegítheti vagy gátolhatja az egyes fehérjék expresszióját, hanem megváltoztathatja a fehérjék mennyiségét (koncentrációját), és poszttranszlációs módosulást (PTM) is okozhat. Az egyes fehérjék több pozícióban történő megjelenése utalhat: az izoformok eltérő szerepére, a különböző szemtermés alkotók különböző izoform regulációjára és a nehezített termesztési körülmény hatására bekövetkező poszttranszlációs módosulásra.

A különböző koncentrációjú 200 μ M és 1 mM kadmium-klorid kezelések hatása a 'Jubilant' árpafajta levélcsírájából származó fehérjék kétdimenziós fehérjemintázatán úgy mutatkozott meg, hogy a kontroll mintához viszonyítva a RuBisCO nagy alegységének mennyisége csökkent. Ezen kívül a kadmium-klorid hatásaként az oxigénfelszabadítást fokozó fehérje (OEE2) expressziójának csökkenése is látható volt. Az eredményeimet irodalmi adatok is alátámasztják.

Az abiotikus stresszhatásokra eltérő expressziót mutató fehérjék további mélyrehatóbb vizsgálata iránymutatásul szolgálhat egy hatékonyabb rezisztencia nemesítés felé. Ez a megközelítés stresszhatásra indukálódó, de még ismeretlen funkcióval rendelkező gének pontos szerepét tisztázhatja, továbbá hozzájárulhat a növényi védekezési rendszer jobb megértéséhez is. A jövőben az abiotikus stresszekkel szembeni rezisztencia kutatásában a vizsgálatok nagyobb számú környezeti stresszekre érzékeny és azokra rezisztens árpafajtákkal való kiterjesztése mindenképpen szükségessé válik, mely a SAM-S detektált izoformjának pontos szerepét is tisztázhatja a stresszhatások alatt.

7. SUMMARY

In my Ph.D. work I conducted research using proteomics (2-DE, MS) in order to study the change of the expressed protein pattern in barley in response to different abiotic stress effects, like high temperature, different growing conditions, high concentration of cadmium and drought. I demonstrated the expression of numerous proteins which are involved in the defense system against abiotic stressors and I also demonstrated the consequence of these kind of stressors to the protein components of our raw food materials. My proteomic approach gave us information about the significant changes of the components of different type of barley cultivars upon abiotic stresses. The high-resolution 2-D gel electrophoresis combined with mass spectrometry proved to be a successful strategy despite the fact that the genome sequence of barley is not yet available. I was able to identify most of the proteins displaying differential protein synthesis upon stresses, which was made possible by the MS and MS/MS capabilities in the mass spectrometric analyses.

First, I compared the two-dimensional protein pattern of seedlings from an abiotic stress-tolerant ‘Mandolina’ and an abiotic stress-susceptible ‘Jubilant’ barley cultivar. One isoform of the protein SAM-S displayed increased expression in the stress-tolerant (Mandolina) cultivar. This isoform was not detectable in the stress-susceptible cultivar, but it was present in the drought tolerant ‘Bivoy’ cultivar. In studying short-term temperature stress on ‘Jubilant’ and ‘Mandolina’ barley shoots, we detected increased protein abundance following stress for several low molecular weight HSPs and isoforms of these proteins.

I next studied the effect of different growing conditions on the protein patterns in the grain of ‘Jubilant’ cultivar. I identified proteins whose expression changed upon abiotic stresses, which included 22,0 kDa (IV class) heat shock protein precursor, GroEL heat shock protein, peroxidase enzyme and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases. I demonstrated that the different growing conditions can induce or inhibit the expression of some proteins, and can also cause post-translational modifications. This was evidenced by the presence of a shift in the position of GAPDH upon stress. Finally, we investigated changes of protein patterns in the seedlings of ‘Jubilant’ barley cultivar after the application of different 200 μ M and 1 mM cadmium-chloride concentrations. There was a decrease of the expression of the RuBisCo large subunit in response to cadmium-chloride. In addition, the oxygen evolving enhancer 2 protein was found to be reduced upon cadmium chloride treatments.

To an in-depth analysis of proteins which show altered expression upon abiotic stresses can help in devising ways to more effective resistance breeding. This kind of approach can help to find functions for stress inducible genes whose functions are still unknown and also can help us to better understand the defense system of plants. It will, therefore, be necessary to investigate in

the future the effect of abiotic stress on the proteome of different barley cultivars and to extend the research to more abiotic stress susceptible and abiotic stress tolerant barley cultivars in order to better understand the role of the detected SAM-S isoform.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- ÁBRAHÁM M., HERMESZ E. K., DEÉR A., BANKA L., NEMCSÓK J. (1999): *Biokémia*. XXIII., A nehézfém stressz és stresszválasz pontyban. 34-37.p.
- ADAS (1990): UK tables of nutritive value and chemical composition of feedingstuffs. Rowett Research Services, Aberdeen (UK)
- AEBERSOLD R., MANN M. (2003):. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422, 198-207.p.
- AGRAWAL G.K., RAKWAL R. (2006): Rice Proteomics: A Cornerstone for Cereal Food Crop Proteomes. *Mass Spectrometry Reviews.*, 25, 1-53.p.
- ALVAREZ S., MARSH E.L., SCHROEDER S.G., SCHACHTMAN D.P. (2008): Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant Cell Environ.* 31(3) 325-340.p.
- ANANTHAN J., GOLDBERG M.L., VOELLMY R. (1986): Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat- shock genes. *Science*, 232, 252-254.p.
- ANDERSON N.G., ANDERSON N.L. (1978): Analytical techniques for cell fractions XXI. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: Multiple isoelectric focusing. *Anal. Biochem.*, 85, 331-340.p.
- ANDERSON L., HOFMAN J., ANDERSON E., WALKER B. (1989): Proceedings of the International Two-dimensional Electrophoresis Conference, Vienna. VCH, Weinheim. 288–297.p.
- BAE W., CHEN X. (2004): Proteomic study for the cellular responses to Cd²⁺ in *Schizosaccharomyces pombe* through amino acid-coded mass tagging and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomic.*, 3, 596–607.p.

- BAK-JENSEN K.S., LAUGESEN S., OSTERGAARD O., FINNIE C., ROEPSTORFF P., SVENSSON B. (2007): Spatio-temporal profiling and degradation of alpha-amylase isozymes during barley seed germination. *FEBS J*, 274 (10) 2552-2565. p.
- BAK-JENSEN K.S., LAUGESEN S., ROEPSTORFF P., SVENSSON B. (2004): Two-dimensional electrophoresis pattern (pI 6-11) and identification of water-soluble barley seed and malt proteins by mass spectrometry. *Proteomics*, 4: 728-742. p.
- BASZCZYNSKY C.L., WALDEN D.B., ATKINSON B.G. (1982): Regulation of gene expression in corn (*Zea mays*, L.) by heat shock. *Can J Biochem.*, 60, 569-579. p.
- BECKER M., NEHRING, K. (1965): Handbuch der Futtermittel. Paul Parey Verlag, Hamburg-Berlin.
- BIEMANN K. (1992): Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem.*, 61, 977-1010. p.
- BJELLQVIST B., EK K., RIGHETTI P.G., GIANAZZA E., GÖRG A., WESTERMEIER R. (1982): Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J.Biochem. Biophys. Methods.*, 6, 317-339.p.
- BOERJAN W., GUY B., VAN MONTAGU M., INZE D. (1994): Distinct phenotypes generated by overexpression and suppression of S-adenosyl-L-methionine synthetase reveal developmental patterns of gene silencing in tobacco. *Plant Cell* 6, 1401–1414.p.
- BOHNERT H.J., AYOUBI P., BORCHERT C., BRESSAN R.A., BURNAP R.L., CUSHMAN J.C., CUSHMAN M.A., DEYHOLOS M., FISCHER R., GALBRAITH D.W., HASEGAWA P.M., JENKS M., KAWASAKI S., KOIWA H., KORE-EDA S., LEE B.-H., MICHALOWSKI C.B., MISAWA E., NOMURA M., OZTURK N., POSTIER B., PRADE R., SONG C.P., TANAKA Y., WANG H., ZHU J.K. (2001): A genomics approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 295-311.p.
- BORÉN M., LARSSON H., FALK, A., JANSSON, C. (2004): The barley starch granule proteome—internalized granule polypeptides of the mature endosperm. *Plant Science*, 166 (3) 617-626. p.

- BRADFORD M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72, 248-254. p.
- BREITENEDER H, RADAUER CA. (2004): Classification of plant food allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113, 821–830.p.
- CHITTOOR J.M., LEACH J.E., WHITE F.F. (1999): Induction of Peroxidase during Defense Against Pathogens. In: Datta, S.K.; Muthukrishnan, S. (ed) *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press. New York. 171-194.p.
- CLARKE A.K., CRITCHLEY C. (1990): Synthesis of early heat shock proteins in young leaves of barley and sorghum. *Plant Physiol.*, 94, 567-576.p.
- CLOSE T.J., KORTT A.A., CHANDLER P.M. (1989): A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant. Mol. Biol.*, 13, 95-108.p.
- COBB K. A., NOVOTNY (1989): High-sensitivity peptide mapping by capillary zone electrophoresis and microcolumn liquid chromatography, using immobilized trypsin for protein digestion, *Anal. Chem.*, 61, 2226-2231.p.
- CORBETT J.M., DUNN M.J., POSCH A., GÖRG A. (1994): Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis*, 15, 1205-1211.p.
- COOKE R.J. (1984): The characterization and. identification of crop cultivars by electrophoresis. *Electrophoresis*, 5, 59-72.p.
- DAHL S.W., RASMUSSEN S.K., HEJGAARD, J. (1996): *J. of Biological Chemistry*, 271, 250-283.p.

- DARLINGTON H.F., TESCO L., HARRIS N., GRIGGS D.L. (2000): Starch granule associated proteins in barley and wheat. *J. Cereal Sci.*, 32,21–29.p.
- DELINCÉE H., HAJÓS GY. (1984): Investigation of Plasteins by "SDS" Polyacrilamide Gel Electrophoresis. *Acta Alimentaria*, 13 (4) 309-313.p.
- DEVREESE B., JANSSEN K.P.C. , VANROBAEYS F. , VAN HERP F. , MARTENS G.J.M., VAN BEEUMEN J. (2002): Automated nanoflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry for a differential display proteomic study on *Xenopus laevis* neuroendocrine cells. *Journal of Chromatography A*, 976, 113–121.p.
- DEVREESE B, VANROBAEYS F, VAN BEEUMEN J. (2001): Automated nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometric identification of proteins from *Shewanella putrefaciens* separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 15 (1) 50-56.p.
- DINYA Z. (2001): Szerves tömegspektrometria. Debrecen. Kossuth Egyetemi Kiadó. 6-50 p.
- ELLIS L. B., ATTWOOD T. K. (2001): Molecular biology databases: today and tomorrow. *Drug Discov. Today*, 6, 509-513.p.
- EVANS D.E., HEJGAARD J. (1999): The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part I: The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1. *Journal of the Institute of Brewing*, 105 (3) 159-169. p.
- FIGEYS D. (2003): Proteomics in 2002: a year of technical development and wide-ranging applications. *Anal Chem.*, 75 (12) 2891-905. p.
- FINNIE C., BAK-JENSEN K.S., LAUGESEN S., ROEPSTORFF P., SVENSSON B. (2006): Differential appearance of isoforms and cultivar variation in protein temporal profiles revealed in the maturing barley grain proteome. *Plant science*, 170, 808-821.p.
- FINNIE C., MELCHIOR S., ROEPSTORFF P., SVENSSON B. (2002): Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiology*, 129, 1308-1319.p.

- FINNIE C., STEENHOLDT T., NOGUERA R. O., KNUDSEN S., LARSEN J., BRINCH-PEDERSEN H., HOLM P.B., OLSEN O., SVENSSON B. (2004): Environmental and transgene expression effects on the barley seed proteome. *Phytochemistry*, 65 (11) 1619-1627.p.
- FINNIE C., SVENSSON B. (2003): Feasibility study of a tissue-specific approach to barley proteome analysis: aleurone layer, endosperm, embryo and single seeds. *Journal of Cereal Science*, 38, 217-227.p.
- FISCHER E.H. (1997): In: Wilkins, M.R.; Williams, K.L.; Appel, R.D.; Hochstrasser, D.F.; editors. *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Berlin: Springer-Verlag.
- FLAVELL R. (1980): The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31, 569-596. p.
- FLENGSRUD R., KOBRO G., (1989): A method for two-dimensional electrophoresis of proteins from green plant tissues. *Anal. Biochem.*, 177, 33-36.p.
- FUTTERWERTTABELLEN der DLG- Schweine. DLG-Verlags-GMBH, (1991): Frankfurt am Main
- GARCIA-CASADO G., CRESPO J.F., RODRIGUES J., SALCEDO G. (2001): Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108, 647-649.p.
- GERGELY V., KÁPOLNA E., SÜLE A., HAJÓS GY., DERNOVICS M., FODOR P. (2004): Preparative liquid isoelectric focusing (Rotofor IEF) based Se-speciation of Se-enriched *Agaricus bisporus*. *J.Anal. At. Spectrom.*, 19, 1-6.p.
- GÖRG A., OBERMAIER C., BOGUTH G., HARDER A., SCHEIBE B., WILDGRUBER R., WEISS W. (2000): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21(6)1037-1053. p.

- GÖRG A., POSTEL W., DOMSCHEIT A., GÜNTHER S. (1988): Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): method, reproducibility and genetic aspects. *Electrophoresis*, 9, 681-692.p.
- GÖRG A., POSTEL W., BAUMER M., WEISS W. (1992a): Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis, with immobilized pH gradients in the first dimension, of barley seed proteins: Discrimination of cultivars with different malting grades. *Electrophoresis*, 13, 192-203.p.
- GÖRG A., POSTEL W., BAUMER M., WEISS W. (1992b): Detection of polypeptides and amylase isoenzyme modifications related to malting quality during malting process of barley by two-dimensional electrophoresis and isoelectric focusing with immobilised pH gradients. *Electrophoresis*, 13, 759-770. p.
- GÖRG A., POSTEL W., GÜNTHER S. (1988): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 9, 531-546.p.
- GÖRG A., WEISS W., DUNN M.J. (2004): Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4, 3665-3685.p.
- GULCICEK E.E., COLANGELO C.M., MCMURRAY W., STONE K., WU T., ZHAO H., SPRATT H., KUROSKY A., WU B., WILLIAMS, K. (2005): Proteomics and the Analysis of Proteomic data: An Overview of Current Protein-Profilng Technologies. In: (ed. Wiley, J.; Sons) *Current Protocols in Bioinformatics*. 13.1.1-13.1.31.p.
- GUTIERREZ C., SANCHEZ-MONGE R., GOMEZ L., RUIZ-TAPIADOR M., CASTAÑERA P., SALCEDO G. (1990): α -amylase activities of agricultural insect pests are specifically affected by different inhibitor preparations from wheat and barley endosperms. *Plant Science*, 72, 37-44.p.
- GYGI SP, RIST B, GERBER SA, TURECEK F, GELB MH, AEBERSOLD R. (1999a) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.*, 17(10) 994-999.p.

- GYGI S.P., ROCHON Y., FRANZA B.R., AEBERSOLD R. (1999b): Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.*, 19, 1720-1730.p.
- GYGI S.P., CORTHALS G. L., ZHANG Y., ROCHON Y., AEBERSOLD R. (2000): Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 9390-9395.p.
- HAJDUCH M, RAKWAL R, AGRAWAL GK, YONEKURA M, PRETOVA A. (2001): Highresolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: Drastic reductions/ fragmentations of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. *Electrophoresis*, 22, 2824–2831.p.
- HAJÓS GY., IDEI M. (2001): Elektroforetikus és elektrokratográfiás módszerek fejlődése és alkalmazási lehetőségei I. *Magyar Kémikusok Lapja*, 56, 364.p.
- HEGEDŰS A., ERDEI S., HORVÁTH G. (2001): Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.*, 160 (6) 1085-1093.p.
- HEGYESNÉ V. B. (2004): Az árpa kémiai összetétele. Az árpa beltartalmi értékei és fiziológiai tulajdonságai a söripari felhasználás szempontjából. 143-153. In: Tomcsányi, A.; Turcsányi, G. (Szerk): *Magyarország Kultúrflórája. Az árpa*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 491 p.
- HEITER P., BOGUSKI M. (1997): Functional genomics: It's all how you read it. *Science*, 278, 601-602.p.
- HILLENKAMP F, KARAS M, BEAVIS RC, CHAIT BT. (1991): Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem.*, 63 (24) 1193A-1203A p.
- HJERTEN S. (1962): "Molecular sieve" chromatography on polyacrylamide gels, prepared according to a simplified method. *Arch. Biochem. Biophys.*, 99, 466.p.

- HOFFMANN-SOMMERGRUBER K. (2000): Plant Allergens and Pathogenesis-related Proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 122, 155-166.p.
- HORVÁTH-SZANICS E., SZABÓ Z., JANÁKY T., PAUK J., HAJÓS GY. (2006): Proteomics as an emergent tool for identification of stress-induced proteins in control and genetically modified wheat lines. *Chromatographia*, 13, 143-147.p.
- HOUDE M., BELCAID M., OUELLET F., DANYLUK J., MONROY A.F., DRYANOVA A., GULICK P., BERGERON A., LAROCHE A., LINKS M.G., MACCARTHY L., CROSBY W.L., SARHAN F. (2006): Wheat EST resources for functional genomics of abiotic stress. *BMC Genomics*, 7,149.p.
- HURKMAN W., TANAKA C. (1988): Polypeptide changes induced by salt stress, water deficit, and osmotic stress in barley roots: a comparison using Two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 9, 781-787.p.
- INRA (1988): L'alimentation des animaux monogastriques. 2eme edition. Tables de l'alimentation des bovins, ovins et caprins. INRA. Paris
- ISHIHARA T., KOBAYASHI E., OKUBO Y., SUWAZONO Y. (2001): Association between cadmium concentration in rice and mortality in the Jinzu River basin, Japan. *Toxicology*, 163 (1) 23-28 p.
- ISLAM N., TSUJIMOTO H., HIRANO H. (2003): Wheat proteomics: Relationship between fine chromosome deletion and protein expression. *Proteomics*, 3, 307–316.p.
- JEROCH H., FLACHOWSKY G., WEISSBACH F.: (1993): Futtermittelkunde. G. Fischer Verlag, Jena-Stuttgart
- JÓRI B. (2004): Növényi Genomika. *Bot. Közlem.*, 91 (1-2): 39-55. p.

- KARAS M., HILLENKAMP F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.*, 60 (20) 2299-2301. p.
- KERSTEN B., FEILNER T., KRAMER A., WEHRMEYER S., POSSLING A., WITT I., ZANOR M.I., STRACKE R., LUEKING A., KREUTZBERGER J., LEHRACH H., CAHILL D.J. (2003): Generation of Arabidopsis protein chips for antibody and serum screening. *Plant Mol. Biol.* 52, 999–1010.p.
- KIM J., DANG C.V. (1993): Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.*, 30, 142-150.p.
- KISMÁNYOKY T. (1996): Árpa, 297-331. p. In: BOCZ E. (szerk.): *Szántóföldi növénytermesztés. Mezőgazdasági kiadó*, Budapest
- KLOSE J. (1975): Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Humangenetik*, 26, 231-243.p.
- KOLLER A., WASHBURN M.P., MARKUS-LANGE B., ANDON N.L., DECIU C., HAYNES P.A., HAYS L., SCHIELTZ D., ULASZEK R., WEI J., WOLTERS D., YATES J.R. (2002): Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proc Natl Acad Sci.*, 99, 11969–11974.p.
- KRAMER A., FEILNER T., POSSLING A., RADCHUK V., WESCHKEW B., URKLE L., KERSTEN B. (2004): Identification of barley CK2a targets by using protein microarray technology. *Phytochemistry*, 65, 1777–1784.p.
- KRISHNAN M., NGUYEN H.T., BURKE J.J. (1989): Heat shock sequences encoding two different small heat shock protein synthesis and thermal tolerance in wheat. *Physiology*, 90 140–145. p.
- KRISTOFFERSEN H.E., FLENGSRUD R. (2000): Separation and characterisation of basic barley seed proteins. *Electrophoresis*, 21, 3693-3700.p.
- KSH (Központi Statisztikai Hivatal) (2008): A fontosabb növények vetésterülete 2008. május 31. *Statisztikai tükrök*, 2, 98, 1. p.

- LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259) 680-685.p.
- LARCHER W. (1987): Stress bei Pflanzen. *Naturwissenschaften*, 74, 158-167. p.
- LÁSZTITY R. (1999a): Cereal Chemistry. Akadémia Kiadó, Budapest, 39-48.p.
- LÁSZTITY R. (1999b): Cereal Chemistry. Akadémia Kiadó, Budapest, 173-182.p.
- LEA P.J., AZEVEDO R.A. (2003): Primary products: plant amino acids. 871-883. p. In: THOMAS B, MURPHY SJ, MURRAY BG (eds): *Encyclopaedia of applied plant sciences*, 3. Elsevier, Amsterdam
- LEE D.G., AHSAN N., LEE S.H., KYU Y.K. JEONG D.B., LEE I.-J., LEE B.-H. (2007): A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. *Proteomics*, 7 (18) 3369-3383. p.
- LEINHOS V., BERGMANN H. (1995): Changes in the yield, lignin content and protein patterns of barley (*Hordeum vulgare* cv. Alexis) induced by drought stress. *Angew. Bot.*, 69, 206-210. p.
- LEPRINCE O., HENDRY G.A.F., MCKERSIE B.D. (1993): The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.*, 3: 231-246. p.
- LODGE, A. (1886): D.A.Report (Thesis)
- LŐRINCZ J. (1984): A sörárpa termesztése. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest 7-131.p.
- LUPOTTO E., GULLI M., RAHO G. (1995): Espressione del gene hvhsp17 in risposta a stress abiotici di varia natura. 205-206.p In: *Atti XXXIX Convegno Annuale Società Italiana di Genetica Agraria*, Vasto Marina, Italy

- MA X.L., WANG Z.L., QI Y.C., ZHAO Y.X, ZHANG H. (2003): Isolation of sadenosylmethionine synthetase gene from *Suaeda salsa* and its differential expression under NaCl stress. *Acta Bot Sin.*, 45, 1359–1365.p.
- MACGREGOR, A. W. (1999): Improving malting quality through biotechnology. *Technical Quarterly*, 36, 3, 345-348.p.
- MACKO V., STEGEMANN H. (1969): Mapping of potato proteins by combined electrofocusing and electrophoresis. Identification of varieties. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 350, 917-919.p.
- MAGNARD J.L., VERGNE P., DUMAS C. (1995): Complexity and Genetic Variability of Heat-Shock Protein Expression in Isolated Maize Microspores. *Plant Physiol.*, 111(4) 1085-1096.p.
- MAJOUL T., BANCEL E., TRIBOI E., HAMIDA J.B., BRANLARD G. (2003): Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from total endosperm. *Proteomics*, 3, 175–183.p.
- MAJOUL T., BANCEL E., TRIBOI E., HAMIDA J.B., BRANLARD G. (2004): Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. *Proteomics*, 4, 505–513.p.
- MANN M., HENDRICKSON R. C., PANDEY A. (2001): Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 437-473.p.
- MARMIROLI N., LORENZONI C., CATTIVELLI L., STANCA A. M., TERZI V. (1989): Induction of heat shock proteins and acquisition of thermotolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). Variations associated with growth habit and plant development. *J. Plant Physiology*, 135, 267-273.p.
- MARMIROLI N., RESTIVO F.M., ODOARDI STANCA M., TERZI V., GIOVANELLI B., TASSI F., LORENZONI C. (1986): Induction of heat shock proteins and acquisition of termotolerance in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Genet Agr.*, 40, 9-25.p.

- MATUZ J. (2000): Gabonafélék, 95. p. In: HAJÓS GY., ZAJKÁS G. (szerk.): *A táplálkozás egészségkönyve*. Budapest: Kossuth Kiadó, 431 p.
- MAYNE M.B., COLEMAN J.R., BLUMWALD E. (1996): Differential expression during drought conditioning of a root-specific S-adenosylmethionine synthetase from jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) seedlings. *Plant Cell Environ.*, 19, 958–966.p.
- MÉCHIN V., BALLIAU T., CHÂTEAU-JOUBERT S., DAVANTURE M., LANGELLA O., NÉGRONI L., PRIOUL J.L., THÉVENOT C., ZIVY M., DAMERVAL C. (2004): A two-dimensional proteome map of maize endosperm. *Phytochemistry*, 65(11)1609-1618.p.
- MOLLOY M. P. (2000): Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem.*, 280 (1) 1-10.p.
- MOLLOY M.P., HERBERT B.R., WALSH B.J., TYLER M.I., TRAINI M., SANCHEZ J.C., HOCHSTRASSER D.F., WILLIAMS K.L., GOOLEY A.A. (1998): Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 19(5) 837-844.p.
- MORIMOTO R.I., TISSIERES A., GEORGOPOULOS C. (1990): Stress Proteins in Biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 442.p.
- MSZ-081326: (1979)
- NÄGELE E., VOLLMER M., HÖRTH P., VAD C. (2004): 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Rev. Proteomics*, 1 (1) 37-46.p.
- NECCHI A., POGNA N.E., MAPELLI S. (1987): Early and late heat shock proteins in wheat and other cereal species. *Plant Physiology*, 84, 1378–1384. p.
- NIELSON G., JOHANSEN H.B. (1986): Proposal for the identification of barley varieties based on the genotypes for 2 hordein and 39 isoenzyme loci of 47 reference varieties. *Euphytica*, 35, 717-728.p.

- O'FARRELL P.H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.*, 250, 4007-4021.p.
- OLSEN O.A. (2001): Endosperm development: cellularization and cell fate specification. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 233-267.p.
- ONG S.E., BLAGOEV B., KRATCHMAROVA I., KRISTENSEN D.B., STEEN H., PANDEY, A., MANN M. (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, 1 (5) 376-386.p.
- ONG S.E., FOSTER L.J., MANN M. (2003): Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*. 29 (2) 124-130.p.
- OSBORNE T. B. (1907): The Proteins of the Wheat Kernel. Carnegie Institute, Washington
- OSCARSSON M., ANDERSSON R., SOLOMONSSON A.C., AMAN P. (1996): Chemical composition of barley samples focusing on dietary fibre components. *J. Cereal Sci.*, 24, 161-170.p.
- ØSTERGAARD O., FINNIE C., LAUGESSEN S., ROEPSTORFF P., SVENSSON B. (2004): Proteome analysis of barley seeds: Identification of major proteins from two-dimensional gels (pI 4–7). *Proteomics*, 4, 2437–2447.p.
- ØSTERGAARD O., MELCHIOR S., ROEPSTORFF P., SVENSSON B. (2002): Initial proteome analysis of mature barley seeds and malt. *Proteomics*, 2, 733-739. p.
- OUGHAM H.J., STODDART J.L. (1986): Synthesis of heat-shock protein and acquisition of thermotolerance in high-temperature tolerant and high-temperature susceptible lines of Sorghum. *Plant Science*, 44 (33) 163-167. p.
- PALMER, G.H. (1991): Ultrastructure of endosperm and quality. Options Méditerranéennes- Serie Seminaires 20, 19-29.p.

- PAYNE P.I., RHODES A.P. (1982): Cereal storage proteins: structure and. role in agriculture and food technology. *Encyc. Plant Physiol.*, 14, 346-369.p.
- PELHAM H. R. B. (1986): Speculation on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell*, 46, 959-961.p.
- PERFUS-BARBEOCH L., LEONHARDT N., VAVASSEUR A., FORESTIER C.(2002): Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.*, 32 (4) 539–548.p.
- PICARD, D., KHURSHEED, B., GARABEDIAN, M. J., FORTIN, M. G., LINDQUIST, S. AND YAMAMOTO, K. R. (1990): Reduced levels of hsp90 compromise steriod receptor action in vivo. *Nature*, 348: 166-168.p.
- PRECZEWSKI P.J., HECKATHORN S.A., DOWNS C.A., COLEMAN J.S., (2000): Photosynthetic thermotolerance is quantitatively and positively correlated with production of specific heat-shock proteins among nine genotypes of *Lycopersicon* (tomato). *Photosynthetica*, 38, 127–134.p.
- QURESHI M.I., QADIR S., ZOLLA L. (2007): Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology*, 164 (10)1239-1260.p.
- RAKWAL R., KOMATSU S. (2000): Role of jasmonate in the rice (*Oryza sativa* L.) self-defense mechanism using proteome analysis. *Electrophoresis*, 21, 2492-2500.p.
- RISTIC Z., GIFFORD D.J., CASS D.D.(1991): Heat Shock Proteins in Two Lines of *Zea mays* L. That Differ in Drought and Heat Resistance. *Plant Physiol.*, 97(4)1430-1434.p.
- ROSE J.K.C., BASHIR S., GIOVANNONI J.J., JAHN M.M., SARAVANAN R.S. (2004): Tackling the plant proteome: Practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.*, 39, 715–733.p.
- ROSENBERG J.M. (1996): Protein analysis and purification: benchtop techniques. Boston

- ROSENFELD J., CAPDEVIELLE J., GUILLEMOT J.C., FERRARA P.(1992): In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 203, 173–179.p.
- ROSENKRANDS I., HEJGAARD J., RASMUSSEN S. K., BJORN S. E. (1994): Serpins from wheat grain. *FEBS Lett.* 343 (1) 75–80.p.
- ROYLE L., AMES J.M., CASTLE L., NURSTEN H.E. (2002): Analysis of malts by capillary electrophoresis. *J. of the Science of Food and Agriculture*, 82,443-451.p.
- SALEKDEH G.H.H., SIOPONGCO J., WADE L.J., GHAREYAZIE B., BENNETT J. (2002): Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2,1131–1145.p.
- SANDER I., FLAGGE A., MERGET R., HALDER T.M., MEYER H.E., BAUR X. (2001): Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol.*, 107, 907–913.p.
- SARRY J.E., KUHN L., DUCRUIX C., LAFAYE A., JUNOT C. , HUGOUVIEUX V., JOURDAIN A, OLIVIER BASTIEN O., FIEVET J.B., VAILHEN D., AMEKRAZ B., MOULIN C., EZAN E., GARIN J., BOURGUIGNON J. (2006): The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics*, 6, 2180–2198.p.
- SARUYAMA H, TANIDA M. (1995): Effect of chilling on activated oxygen scavenging enzymes in low temperature-sensitive and –tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.*,109:105–113.p.
- SHEN B., LI C.J., TARCZYNSKI M.C. (2002): High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the *Arabidopsis* S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. *Plant J.*, 29, 371–380.p.
- SHEVCHENKO A, LOBODA A, ENS W, STANDING KG. (2000): MALDI quadrapole time-of-flight mass spectrometry: A powerful tool for proteomic research. *Anal. Chem.*, 72, 2132–2141.p.

- SHEWRY P.R., MIFLIN B.J. (1983): Characterization and synthesis of barley seed proteins. 143.p. In: GOTTSCHALK W., MÜLLER H. (eds.): *Seed Proteins, Biochemistry, Genetics, Nutritive Value*. Martinus Nijhoff Publ., The Hague.
- SHEWRY P.R., MIFLIN B.J. (1985): Seed storage proteins of economically important cereals. 1-83.p. In: POMERANZ Y., (eds.) *Advances in Cereal Science and Technology*. 7., AACC, St. Paul
- SHI Q., JACKOWSKY G. (1998): One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. pp.10. In: HAMES B.D. (eds.) *Gel Electrophoresis of Proteins. A practical Approach*. (third edition) Oxford University Press.
- SHI Y., XIANG R., HORVÁTH C., WILKINS J.A. (2004): The role of liquid chromatography in proteomics, *J. Chromatogr. A*, 1053 (1-2) 27-36.p.
- SIMON-SARKADI L., LESKÓ K., STEFANOVITSNÉ B.É. (2003): A nehézfémek okozta stressz hatása a búzanövény biológiailag aktív komponenseire. 313. *Tudományos Kollokvium előadásainak rövid kivonata* 285, 2.p.
- SKYLAS D.J., COPELAND L., RATHMELL W.G., WRIGLEY C.W. (2001): The wheat-grain proteome as a basis for more efficient cultivar identification. *Proteomics*, 1(12)1542-1546.p.
- SKYLAS D., CORDWELL S., HAINS P., LARSEN M., BASSEAL D., WALSH B., BLUMENTHAL C., RATHMELL W., COPELAND L., WRIGLEY C. (2002): Heat shock of wheat during grain filling: proteins associated with heat-tolerance. *J. Cereal Sci.*, 35, 175–188.p.
- STASYK T., HUBER L.A. (2004): Zooming in: fractionation strategies in proteomics. *Proteomics*, 4(12)3704-3716. p.
- STEMMANN O., ZOU H., GERBER S.A., GYGI S.P., KIRSCHNER M.W. (2001): Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell*, 14 (107) 715-726. p.

- STEWART C. R., VOETBERG G. (1985): Relationship between stress-induced ABA and proline accumulation and ABA-induced proline accumulation in excised barley leaves. *Plant Physiol.*, 79, 24-27.p.
- SUN W., VAN MONTAGUE M., VERBRUGGEN N. (2002): Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Bioch et Biophy Acta*, 1577, 1-9. p.
- SÜLE A., VANROBAEYS F., HAJÓS GY., VAN BEEUMEN J., DEVREESE B. (2004): Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. *Phytochemistry*, 65, 1853-1863.p.
- SVENSSON B. (1994): Protein engineering in the alpha-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol Biol.*, 25(2) 141-57.p.
- SVENSSON B., FUKUDA K., NIELSEN P.K., BØNSAGER B.C. (2004): Proteinaceous α -amylase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696, 145-156.p.
- SZIGETI Z. (1998): Növények és a stressz. In: Láng, F. (Szerk.) *Növényélettan. A növényi anyagszerve.* ELTE, Eötvös Kiadó
- TAKEUCHI K., NAKAMURA K., FUJIMOTO M., KAINO S., KONDOH S., OKITA K. (2002): Heat stress-induced loss of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) in a human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2, analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 23, 662–669.p.
- THIEDE B., HÖHENWARTER W., KRAH A., MATTOW J., SCHMID M., SCHMIDT F., JUNGBLUT P.R. (2005): Peptide mass fingerprinting. *Methods*, 35, 237-247.p.
- THIELLEMENT H., ZIVY M., PLOMION C. (2002): Combining proteomic and genetic studies in plants. *Journal of Chromatography B*, 782, 137-149.p.
- THOMPSON J.E., HOPKINS M.T., TAYLOR C., WANG T.W. (2004): Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: implications for plant growth and development. *Trends in Plant Science*, 9 (4) 174-179.p.

TISELIUS A. (1937): Electrophoresis of serum globulin. Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochem J.*, 31(9) 1464–1477. p.

TOMCSÁNYI A., KISMÁNYIKY T. (1993): Árpatermesztési ismeretek. Gazdafüzetek 2. Regiocon Kft., Kompolt.

TOMMASINI L., SVENSSON J.T., RODRIGUEZ E.M., WAHID A., MALATRASI M., KATO K., WANAMAKER S., RESNIK J., CLOSE T.J. (2008): Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare L.*). *Functional & Integrative Genomic*, 8 (4) 387-405.p.

TOPPI L. S., GABBRIELLI R. (1999): Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 105-130.p.

TURNER L.B., STEWART G. R. (1986): The effect of water stress upon polyamine levels in barley (*Hordeum vulgare L.*) leaves. *J. Exper. Bot.*, 37,170-177.p.

UNLU M., MORGAN M.E., MINDEN J.S. (1997): Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 18:2071–2077.p.

VARGA-HASZONITS Z. (1985): Az 1983 évi szárazság agrometeorológiai értékelése. *Növénytermesztés*, 34, 61-67.p.

VIDO K., SPECTOR D., LAGNIEL G., LOPEZ S., TOLEDANO M.B., LABARRE J. (2001): A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol.Chem.*, 276 (11) 8469–8474.p.

VIERLING E. (1991): The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 579-620.p.

WANG T.W., LU L., ZHANG C.G., TAYLOR C., THOMPSON J.E. (2003): Pleiotropic effects of suppressing deoxyhypusine synthase expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.*, 52 (6) 1223-1235.p.

- WATSON B.S., ASIRVATHAM V.S., WANG L., SUMNER L.W. (2003): Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiology*, 131(3) 1104-1123.p.
- WEISS W., POSTEL W., GÖRG A. (1991): Barley cultivar discrimination. 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis and glycoprotein blotting. *Electrophoresis*, 12, 323–330.p.
- WEISS W., POSTEL W., GÖRG A. (1992a): Application of sequential extraction procedures and glycoprotein blotting for the characterization of the 2-D polypeptide patterns of barley seed proteins. *Electrophoresis*, 13, 770-773. p.
- WEISS W., POSTEL W., GÖRG A. (1992b): Qualitative and quantitative changes in barley seed protein patterns during the malting process analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis with respect to malting quality. *Electrophoresis*, 13, 787-797.p.
- WILKINS M.R., SANCHEZ J.C., WILLIAMS K.L., HOCHSTRASSER D.F. (1996): Current challenges and future applications for protein maps and posttranslational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis*, 17, 830–838.p.
- YAMASHITA M., FENN J. B. (1984): Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Phys. Chem.*, 88, 4451-4459. p.
- ZENOBI R., KNOCHENMUSS R. (1998): Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 17 (5) 337 – 366. p.
- ZHANG Q., REICHERS D.E. (2004): Proteomic characterization of herbicide safener-induced proteins in the coleoptile of *Triticum tauschii* seedlings. *Proteomics*, 4, 2058–2071.p.

[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni a segítséget a Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézetben Dr. Bánáti Diána főigazgatónőnek, hogy lehetővé tette kísérleteim a KÉKI Táplálkozástudományi Osztályán történő elvégzését.

Köszönöm Dr. Hajós Gyöngyi † és Dr. Hoschke Ágoston témavezetőimnek a kísérletek megvalósításához adott támogatásukat, áldozatkész munkájukat, amellyel mindvégig segítettek engem.

A gabonaminták biztosítását és a sok termesztéssel kapcsolatos információ átadását nagyon szépen köszönöm Dr. Tomcsányi Andrásnak (Gabonatermesztési Kutató Kht., Szeged).

A tömegspektrometriás vizsgálatokat köszönöm Dr. Bart Devreesenek (Ghent) és Dr. Janáky Tamásnak (SZOTE).

Köszönök továbbá minden segítséget és biztatást a KÉKI Táplálkozástudományi Osztály és az Intézet dolgozóinak: Dr. Szabó Erzsébetnek, Némethné Dr. Szerdahelyi Emőkének, Dr. Szamos Jenőnek, Horváthné Dr. Szanics Enikőnek, Háderné Sólyom Katalinnak, , Tömösköziné Dr. Farkas Ritának, Nagyné dr. Gasztonyi Magdolnának, Dr. Daood Husseinnek, Sziklai Zsuzsának, Záray Lukács Istvánnának, Újhelyi Gabriellának, Takács Krisztinának, továbbá a Budapesti Corvinus Egyetem Sör-és Szeszipari Tanszéke összes munkatársának, valamint Dr. Mátrai Beátának, Dr. Süle Sándornak, Dr. Haskó Györgynek, Dr. Hegedűs Attilának, Dr. Lukács Noéminek, Szálji Emíliának, Bovier Hajnalkának, Pós Veronikának, Kiss Róbertnek, barátaimnak és Családomnak.